

SÉRIE A, N° 223

N° D'ORDRE :

247

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

V. CHORINE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CHEZ LES INSECTES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le 9 juillet 1931 devant la Commission d'examen.

Président : MM. CAULLERY

Examineurs } CH. PÉREZ
GUILLIERMOND

PARIS

Édition du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

—
1931

SÉRIE A, N° 223

N° D'ORDRE :

247

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

PAR

V. CHORINE

1^{re} THÈSE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CHEZ LES INSECTES.

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1931 devant la Commission d'examen.

Président : MM. CAULLERY

Examineurs { Ch. PÉREZ
GUILLIERMOND

PARIS

Édition du Bulletin Biologique de la France et de la Belgique
105, Boulevard Raspail

1931

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen..... C. MAURAIN, Professeur, Physique du globe.

Doyen honoraire.... M. MOLLIARD.

Profess. honoraires. { H. LE CHATELIER. A. LEDUC.
H. LEBESGUE. E. HEROUARD.
A. FERNBACH.

ÉMILE PICARD..... Analyse supér. et algèbre supérieure.
E. GOURSAT..... Calcul différentiel et calcul intégral.
G. KOENIGS..... Mécanique physique et expérimentale.
P. JANET..... Electrotechnique générale.
F. WALLERANT... Minéralogie.
P. PAINLEVÉ..... Mécanique anal. et mécanique céleste.
M. CAULLERY..... Zoologie (Evolution des êtres organisés)
ÉMILE BOREL..... Calcul des probabilités et phys. mathém.
H. ABRAHAM..... Physique.
M. MOLLIARD..... Physiologie végétale.
E. CARTAN..... Géométrie supérieure.
GABRIEL BERTRAND Chimie biologique.
JEAN PERRIN..... Chimie physique.
L. LAPICQUE..... Physiologie générale.
M^{me} P. CURIE..... Physique générale et radioactivité.
G. URBAIN..... Chimie générale.
L. MARCHIS..... Aviation.
E. VESSIOT..... Théorie des fonct. et th. des transf.
A. COTTON..... Physique générale.
J. DRACH..... Application de l'analyse à la géométrie.
CHARLES FABRY... Physique.
R. LESPIEAU..... Théories chimiques.
P. PORTIER..... Physiologie comparée.
CHARLES PÉREZ... Zoologie.
E. BLAISE..... Chimie organique.
P.-A. DANGEARD.. Botanique.
RÉMY PERRIER... Zoologie (Enseignement P. C. N.).
LÉON BERTRAND... Géolog. structurale et géolog. appliquée.
E. RABAUD..... Biologie expérimentale.
G. JULIA..... Mathématiques générales.
PAUL MONTEL..... Mécanique rationnelle.
V. AUGER..... Chimie appliquée.
P. WINTREBERT... Anatomie et histologie comparées.
O. DUBOSQ..... Biologie maritime.
EUGÈNE BLOCH... Physique théorique et phys. céleste.
A. MAILHE..... Etude des combustibles.
L. LUTAUD..... Géogr. physique et géol. dynamique.
HENRI VILLAT... Mécanique des fluides et applications.
CH. JACOB..... Géologie.
P. PASCAL..... Chimie minérale.
LÉON BRILLOUIN.. Théories physiques.
E. ESCLANGON... Astronomie.
H. BENARD..... Mécanique expérimentale des fluides.

C. MAUGUIN.... Minéralogie.
L. BLARINGHEM Botanique.
E. PÉCHARD..... Chimie (Ens. P. C. N.)
A. GUILLET..... Physique.
M. GUICHARD... Chimie minérale.
A. MICHEL-LEVY Pétrographie.
A. DEREIMS..... Géologie.
A. DENJOY..... Calcul diff. et int.
H. MOUTON..... Chimie physique.
A. DUFOUR..... Physique (P. C. N.).
L. DUNOYER... Optique appliquée.
M. JAVILLIER... Chimie biologique.
ROBERT-LEVY... Zoologie.
A. DEBIERNE... Radioactivité.
E. DARMOIS..... Physique.
G. BRUHAT..... Physique.
A. GUILLIERMOND Botanique (P.C.N.).
F. PICARD..... Zoologie (Evolution des êtres organisés).
L. JOLEAUD..... Paléontologie.
M. FRECHET..... Calcul des probabilités et phys. mathém.
M^{me} RAMART-LUCAS Chimie organique.
BEGHIN..... Méc. théor. des fluides.
FOCH..... Méc. expér. des fluides.
PAUTHENIER... Physique (P. C. N.).
VILLEY..... Mécanique physique et expérimentale.
De BROGLIE..... Théories physiques.
LABROUSTE..... Physique du Globe.
FREUNDLER..... Chimie (P. C. N.).
PRENANT..... Zoologie.
P. JOB..... Chimie générale.
CHRETIEN..... Optique appliquée.

Secrétaire..... A. PACAUD



V. CHORINE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ CHEZ LES INSECTES

SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION	292
I. — MATÉRIEL ET MÉTHODES UTILISÉS AU COURS DE NOS RECHERCHES	297
II. — IMMUNITÉ NATURELLE DES INSECTES	305
A. — <i>Immunité naturelle contre les microbes.</i>	305
B. — <i>Immunité naturelle des insectes contre les poisons solubles.</i>	315
III. — IMMUNITÉ ACQUISE ENVERS LES MICROBES CHEZ LES INSECTES	322
A. — <i>Immunité active.</i>	322
B. — <i>Immunité passive chez les insectes.</i>	345
IV. — MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ CONTRE LES MICROBES CHEZ LES INSECTES	348
V. — IMMUNITÉ ACQUISE CONTRE LES SUBSTANCES SOLUBLES	371
A. — <i>Immunité active.</i>	371
B. — <i>Immunité passive.</i>	376
VI. — CONCLUSION	382
BIBLIOGRAPHIE	388

INTRODUCTION

L'immunité est une résistance de l'organisme envers des parasites et envers des liquides toxiques.

On distingue différents types d'immunité :

Premièrement, l'immunité naturelle ou innée — la résistance de l'organisme à l'état naturel, contre les divers microbes et les toxines. Par exemple, la résistance des animaux de laboratoire (cobayes, lapins, souris) vis-à-vis des bacilles lépreux, la résistance des poules contre les bacilles tuberculeux humain, etc.

On distingue également l'immunité naturelle absolue quand il est impossible de conférer la maladie, comme dans le premier exemple ci-dessus, et l'immunité naturelle relative, comme par exemple la résistance des rats contre le bacille charbonneux et la toxine diphtérique et la résistance des lapins contre l'infection à staphylocoque.

Deuxièmement, dans certains cas, on peut créer par une vaccination préalable de l'organisme, une résistance qui s'établit en 10 à 20 jours ordinairement, une immunité qui n'existait pas auparavant : c'est l'immunité acquise active.

Il me semble inutile de donner des exemples de cette immunité, car on en voit journellement dans la vie.

Si on prend le sang ou le sérum des animaux immunisés, et qu'on l'injecte aux animaux neufs, on leur confère une immunité temporaire — immunité acquise passive, qui s'établit presque instantanément. L'exemple classique nous est fourni par le sérum antidiphtérique.

Comme nous l'avons dit, il est possible de créer de l'immunité, non seulement contre les microbes, mais aussi contre certains poisons solubles, bactériens ou d'autres.

Le mécanisme de l'immunité contre les microbes et contre les poisons solubles est très différent, et nous avons estimé utile

de séparer dans la suite de notre exposé ces deux groupes de phénomènes en deux chapitres.

La question de l'immunité chez les invertébrés a attiré l'attention des savants, surtout dans ces dernières années.

Depuis dix ans environ, un nombre considérable de travaux très importants a été effectué sur ce sujet. Cette abondance s'explique par l'intérêt que présente cette question.

Comme l'immunité est un phénomène commun à tous les êtres vivants, on la trouve aussi bien chez les plantes que chez les microbes et les protistes, chez les animaux supérieurs et chez l'homme.

Il est inutile de rappeler la valeur de l'immunité dans la lutte contre les maladies microbiennes, mais jusqu'à présent, plusieurs phénomènes de l'immunité restent encore obscurs, et l'étude de l'immunité chez les animaux inférieurs pourrait nous donner quelques nouvelles explications.

Comme on le sait, METCHNIKOFF a observé le phénomène de la phagocytose pour la première fois sur les daphnies.

On connaît également un grand nombre d'insectes qui transmettent les diverses maladies. On peut estimer que l'étude de l'immunité chez les insectes pourrait être utile aux recherches sur la transmission des maladies par les insectes.

D'autre part, nous pouvons tirer de ces études quelques connaissances utiles dans la lutte contre les maladies des insectes, tels que les abeilles et les vers à soie.

Enfin on a essayé d'utiliser les microbes dans la lutte contre les insectes nuisibles, et on a déjà obtenu des résultats encourageants.

SERGEANT, en Afrique, a essayé d'appliquer le microbe de d'HERELLE pour combattre les criquets, mais il a trouvé que les sauterelles étaient déjà immunisées contre ce microbe par une maladie bénigne qui sévissait parmi ces insectes.

Il est donc évident que les connaissances sur l'immunité pourront servir dans la lutte par la méthode bactériologique contre les insectes nuisibles.

Maintenant, nous allons exposer brièvement l'état actuel de nos connaissances sur l'immunité des insectes. Comme nous avons donné une partie historique pour les diverses questions

avant chaque chapitre, ici nous n'indiquerons qu'en traits généraux l'évolution de l'étude de cette branche de la science.

C'est PASTEUR qui, en 1870, étudia en détail, les flacheries et la pébrine des vers à soie, établissant en même temps la base scientifique de nos notions des maladies des insectes. METCHNIKOFF a démontré l'importance que peuvent avoir l'étude de l'immunité chez les Invertébrés pour l'explication des divers phénomènes de l'immunité chez les animaux supérieurs et chez l'homme. C'est lui qui a étudié le premier l'immunité naturelle des larves d'*Oryctes nasicornis* envers le bacille charbonneux, le bacille diphtérique et le vibrion du choléra, KOVALEVSKY et BALBIANI ont étudié l'immunité naturelle de plusieurs espèces d'insectes vis-à-vis des divers microbes. Depuis 1906, MÉTALNICOV et ses élèves ont étudié en détail l'immunité naturelle des chenilles de *Galleria mellonella* vis-à-vis des microbes les plus divers. PAILLOT, HOLLANDE, VICHER, AGHAR et d'autres, ont apporté de nombreuses observations des plus intéressantes sur la résistance des insectes. Nous avons étudié le rôle que joue le facteur microbe dans l'immunité des insectes, et nous avons démontré quelle est l'importance de l'acidité du milieu de culture sur la virulence des microbes pour les insectes (Voir le chapitre II).

METCHNIKOFF n'a pas réussi à immuniser les larves des vers blancs contre le charbon. MESNIL et KOVALEVSKY n'ont pas pu immuniser les scolopendres contre le même microbe. CANTACUZÈNE fut le premier qui réussit à immuniser certains Invertébrés (*Sipunculus nudus* et quelques Décapodes marins) contre des doses mortelles de microbes.

MÉTALNICOV et PAILLOT ont démontré qu'il est possible d'immuniser les insectes contre les doses mortelles des microbes. Depuis, on a beaucoup étudié l'immunité active des insectes, et on a démontré qu'il est possible de les immuniser par divers procédés : 1° par injection de microbes tués ou affaiblis par la chaleur ; 2° par l'injection d'une dose minime d'une culture jeune virulente ; 3° par injection des cultures vieilles d'un microbe virulent et 4° par injection du bactériophage correspondant. Nous avons réussi à immuniser les chenilles de la mite des abeilles contre le microbe sporogène le plus virulent au moyen d'une culture asporogène affaiblie, que nous avons

obtenue de ce microbe par le procédé bien connu du docteur Roux.

D'autre part, nos recherches personnelles ont démontré qu'il existe une quantité du vaccin optimal qui assure le mieux l'immunité, et il est évident que cette concentration varie suivant le microbe.

D'après les travaux de GLASER, d'AGHAR, de d'HÉRELLE, et de moi-même, il ressort que l'immunité générale ne peut pas être créée chez les insectes par l'absorption du vaccin par la voie buccale : ce sont les cellules de l'intestin qui acquièrent une résistance plus forte.

Nous avons étudié beaucoup la spécificité de l'immunité antimicrobienne acquise chez les insectes, et nous avons démontré qu'elle est loin d'être spécifique.

ZERNOFF et AGHAR ont mis en évidence la possibilité de l'immunité passive chez les insectes. ZERNOFF a étudié le mécanisme de ce phénomène (Voir chapitre III).

L'immunité naturelle contre les toxines solubles a été étudiée en premier par METCHNIKOFF. Il n'a pas trouvé d'insectes sensibles vis-à-vis des toxines tétaniques, ni vis-à-vis de la toxine botulinique. D'après les travaux de METCHNIKOFF, de SAUNDERS, de DICKSON, de BENGSTON, de BISHOP et de MÉTALNICOV, il ressort que les insectes sont complètement réfractaires vis-à-vis des poisons bactériens solubles. La toxine injectée reste très longtemps non absorbée dans l'organisme de l'insecte, sans provoquer une réaction quelconque de l'organisme.

En injectant les chenilles (*Galleria mellonella* et *Pyrausta nubilalis*) avec la toxine diphtérique, nous avons vu qu'elles sont sensibles vis-à-vis de cette substance, surtout les chenilles de la mite des abeilles. Nous avons réussi à immuniser ces chenilles contre la toxine des bacilles diphtériques, par l'injection répétée d'anatoxine de RAMON, et nous avons démontré que cette immunité est provoquée par l'apparition, dans le sang des insectes, d'antitoxine neutralisant la toxine diphtérique et qui est comparable à l'antitoxine des animaux supérieurs ; mais les chenilles produisent l'antitoxine d'une façon faible et irrégulière. C'est, pourrait-on dire, l'ébauche de cette propriété remarquable que possèdent les animaux à sang chaud d'une façon plus constante et plus développée (Voir chapitre V).

Je suis très heureux de remercier M. E. Roux, Directeur de l'Institut Pasteur, qui m'a donné la possibilité d'effectuer ce travail ; et d'exprimer ma profonde gratitude à M. le Professeur MÉTALNICOV qui a dirigé mes recherches pendant plusieurs années.

CHAPITRE PREMIER

MATÉRIEL ET MÉTHODES UTILISÉES AU COURS DE NOS RECHERCHES

Avant de commencer d'exposer la question, nous devons nous arrêter sur la technique utilisée au cours de nos recherches.

Nos études se sont surtout portées sur les chenilles de *Galleria mellonella* L., *Pyrausta nubilalis* Hbn. et certains autres insectes.

Les chenilles de la mite des abeilles présentent un matériel précieux pour ce genre de recherches, car elles se développent parfaitement bien au laboratoire, et, par suite, ne souffrent pas au cours des expériences du changement des conditions extérieures : température, humidité, etc... comme tous les insectes recueillis dans les champs ou dans les forêts peu de jours avant.

Des indications nécessaires sur la culture de *Galleria* ont été données par M. METALNICOV dans son excellent livre. Cette culture est très facile, et on peut avoir un matériel inépuisable pendant toute l'année. De plus, ces chenilles sont extrêmement résistantes et supportent très bien toutes les manipulations qu'elles subissent au cours des expériences.

Nos cultures de *Galleria* se sont développées à la température de 30°, et presque toutes nos expériences sur l'immunisation ont été faites aussi au même degré de température.

Presque toute la technique que nous allons exposer a été élaborée par M. METALNICOV au cours de ses recherches et nous donnons seulement quelques indications complémentaires.

Avant de commencer l'immunisation contre n'importe quel microbe, il faut déterminer d'une façon précise la dose minima mortelle de ce microbe, car l'immunité acquise n'est pas toujours très forte. En injectant la dose massive du microbe, on

risque de ne pas l'apercevoir, et en injectant la dose faible, on peut ne pas dépasser la dose minima mortelle pour les insectes normaux.

Cette opération est très simple : il faut prendre une culture de microbes toujours du même âge. Nous avons pris ordinairement les cultures de 24 heures pour les microbes qui poussent vite (la plupart des microbes) et la culture de 48 heures pour ceux qui poussent plus lentement. Pour les bacilles tuberculeux, l'âge de la culture ne joue pas un rôle important, à cause de son manque de virulence pour les insectes.

Une culture de 24 ou 48 heures sur la gélose inclinée doit être émulsionnée dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. A partir de cette émulsion-mère, on prépare plusieurs émulsions de plus en plus faibles, en ajoutant une ou plusieurs anses, ou même, si le microbe n'est pas très pathogène : une, deux, trois ou plusieurs gouttes de l'émulsion initiale dans les tubes contenant chacun 1 centimètre cube d'eau physiologique. Si la nature des microbes à étudier est inconnue, on commence par préparer les trois émulsions suivantes :

Dans trois petits tubes à hémolyse, on met 1 centimètre cube d'eau physiologique (dans chacun). Dans le premier, on délaye une anse, dans le second, 1 goutte, et dans le troisième, 10 gouttes de l'émulsion-mère. On injecte quelques chenilles avec 1/100 de centimètre cube de chacune de ces émulsions.

Si par exemple les chenilles résistent à l'injection de la première et de la deuxième dilution, tandis que la troisième les tue, on cherche à préciser la dose mortelle en préparant des émulsions contenant : 3, 5, 7 et 9 gouttes de l'émulsion-mère dans 1 centimètre cube d'eau physiologique, etc... La dose minima mortelle trouvée reste très constante, si les conditions des expériences ne varient pas (la température, l'âge des cultures et des insectes, etc...).

Cette méthode, bien qu'étant moins précise que la numération des microbes, donne néanmoins des résultats tout à fait satisfaisants, et, pour le travail courant, elle peut être seule employée, car la numération des microbes est assez compliquée et demande beaucoup de temps.

Cependant HOLLANDE, AGHAR et VICHER ont utilisé la numération des microbes au cours de leurs recherches.

Une fois que la dose minima mortelle est déterminée, on peut commencer l'immunisation. Pour préparer le vaccin, on peut se servir de la culture de microbes n'ayant que quelques jours, ou même parfois plusieurs semaines.

Comme vaccin, nous nous sommes servi presque toujours des microbes tués ou affaiblis par la chaleur. Pour cela, on chauffe les microbes une demi-heure ou une heure à la température de 58° à 60° . Il est toujours préférable d'utiliser le vaccin fraîchement préparé, car il peut arriver que quelques microbes aient survécu au chauffage et au bout de quelque temps se soient multipliés : le vaccin devient alors très pathogène.

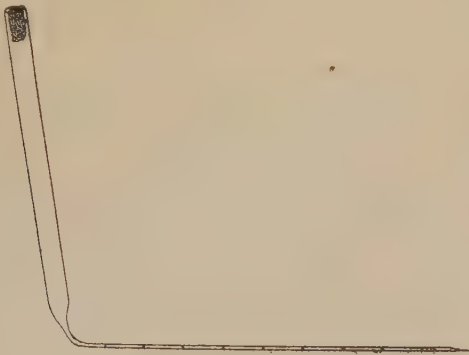


Fig. 1.

Nous indiquons dans le troisième chapitre les méthodes spéciales de vaccination.

Injections de vaccin, de virus et de tous les liquides aux chenilles. — Nous les avons faites au moyen de la pipette de PASTEUR graduée, dont chaque division, d'un centimètre de longueur, correspond approximativement à $1/100$ de centimètre cube (Fig. 1).

Nous nous sommes toujours servi des pipettes dont la partie fine est d'un diamètre plus ou moins constant. Nous avons toujours plié la pipette à la base de la partie fine de 90° . Le bout de la partie fine doit être très effilé. Nous le faisons toujours sur la veilleuse du bec de Bunsen. C'est le moment le plus important : il ne faut pas faire le bout trop fin, car dans ce cas,

le liquide ne passe que difficilement, ni trop large, car on déchire trop la chitine de l'insecte et on provoque une hémorragie abondante. On divise la partie fine de la pipette en centimètres.

La quantité de liquide que peuvent supporter les insectes varie suivant leur grandeur. Il est évident que l'injection d'un grand volume de liquide peut avoir une action nocive purement mécanique. Les chenilles de 2 à 3 centimètres de longueur (*Pyrausta nubilalis* Hbn, *Galleria mellonella* L.) supportent sans aucun inconvénient l'injection de 1/200 à 1/50 de centimètre cube.

Au cours de nos recherches, nous avons presque toujours injecté le vaccin et le microbe vivant dans 1/100 de centimètre cube de liquide.

Quand on a un peu de pratique, on réussit facilement à inoculer les chenilles sans provoquer la moindre hémorragie. Il est préférable d'introduire la pipette sur un côté de la chenille plutôt qu'au milieu du corps à la limite de deux segments.

Une fois que la chitine est percée, il faut introduire la pipette parallèlement à l'épiderme sans l'enfoncer. Pendant cette opération, on tient la chenille entre le pouce et l'index de la main gauche sans la trop presser, car autrement il est très difficile d'inoculer le liquide. En observant toujours les graduations, et en soufflant doucement, on arrive à injecter la quantité voulue de liquide.

Nous mettons les chenilles injectées dans de petits bocaux en verre, avec quelques morceaux de papier filtre plissé.

Prise de sang. — Pour préparer les frottis du sang, on le prend au moyen d'un tube capillaire ouvert d'un côté et très effilé de l'autre.

On introduit ce tube d'un côté de la chenille à la limite de deux segments et le sang monte dans le tube.

Au moyen de cette méthode, on peut prendre une petite goutte de sang qui suffit largement pour faire un ou deux frottis. Si on désire recueillir plus de sang pour l'analyse, l'étude sérologique et l'immunité passive, il faut opérer de la manière suivante : on coupe avec les ciseaux une des pattes de la deuxième ou de la troisième paire, et doucement on presse la chenille entre le pouce et l'index. Avec cette méthode, on peut

saigner la chenille « à blanc » et ramasser une ou deux grosses gouttes de sang.

Si on désire prendre le sang stérilement, on met, avant la prise de sang, les chenilles dans l'eau phéniquée de 2 à 3 0/0 pendant 3 à 10 minutes. Après on peut les transporter pour un temps assez court dans l'éther. Il ne faut pas les laisser plus d'une minute environ dans l'éther, car très souvent, quand le bain d'éther est trop prolongé, l'intestin des chenilles éclate et le sang se trouve infecté par le contenu intestinal. Il est curieux de constater que les chenilles de *Galleria* peuvent supporter une désinfection pareille, et qu'après avoir été saignées, au bout d'une demi-heure, elles recommencent à se mouvoir, se rétablissent en peu de temps, et continuent leur développement.

Le sang recueilli doit être recouvert avec une couche d'huile de vaseline ou d'huile de paraffine, car le sang des insectes s'oxyde très rapidement à l'air et prend une couleur d'un brun noirâtre. Il devient alors très toxique pour les insectes. Souvent une injection de 1/100 de centimètre cube de sang oxydé suffit pour provoquer la mort des chenilles en quelques minutes.

Fixation et coloration de frottis. — Au cours de nos recherches, nous n'avons jamais utilisé les frottis humides. Nous avons préparé les frottis fins en étalant le sang sur la lame avec une lamelle ou au moyen d'un tube capillaire de la même manière qu'on pratique pour le sang des animaux supérieurs. Les frottis sont séchés à l'air.

Pour colorer les frottis avec le Giemsa, ou avec le bleu de méthylène, il est préférable de fixer les frottis avec l'alcool méthylique pendant 10 ou 15 minutes, et, après la fixation, on les laisse sécher à l'air. On peut les fixer aussi avec un mélange en partie égale d'éther et d'alcool éthylique pendant 5 à 10 minutes, ou par l'alcool éthylique absolu pendant 10 minutes.

Parfois, pour l'examen bactériologique, il suffit de fixer les frottis par flambage et de colorer pendant quelques secondes avec le bleu de méthylène, mais ce mode de coloration est très imparfait et donne des résultats assez inconstants.

On obtient des résultats plus stables avec le bleu de méthylène, après la fixation à l'alcool. Dans tous les cas, si on dispose d'un peu de temps, il est préférable d'utiliser le Giemsa

ou le mélange de bleu de Borrel et éosine. La solution de Giemsa que nous utilisons toujours est une goutte de Giemsa R. Rall par 1 centimètre cube d'eau distillée. On laisse agir le colorant pendant 30 minutes environ, on lave à l'eau courante et on le sèche à l'air ou entre deux feuilles de papier filtre. Le deuxième colorant, qui donne des résultats un peu meilleurs que Giemsa, est utilisé de la manière suivante :

Dans 5 centimètres cubes d'eau du robinet, on ajoute 6 gouttes de bleu de Borrel et 3 gouttes d'éosine. On mélange et on met la solution sur les frottis fixés par l'alcool méthylique. On laisse agir le colorant pendant 10 à 15 minutes et on lave les lames à l'eau courante. La quantité de bleu de Borrel et de l'éosine ajoutée pour 5 centimètres cubes peut être modifiée largement. Pour le sang de différents insectes, on doit rechercher une concentration optima de colorants. D'une façon générale, plus on ajoute d'éosine, plus la coloration devient lente.

La proportion que je viens d'indiquer convient très bien pour le sang de *Galleria*.

Mais les meilleurs résultats que nous ayons obtenus l'ont été en fixant les frottis desséchés par la solution de May-Grünwald, pendant 3 à 5 minutes. On met 12 ou 15 gouttes de May-Grünwald sur le frottis ; on le recouvre avec une boîte de Pétri. Au bout de 3 à 5 minutes, on ajoute sur le frottis 6 ou 7 gouttes d'eau distillée et on la mélange bien avec le May-Grünwald. On laisse agir le mélange pendant 2 ou 3 minutes au plus, car si on le laisse plus longtemps, il se forme assez souvent un précipité.

On égoutte le liquide, et sans laver on transporte le frottis dans le deuxième colorant.

Nous avons essayé de colorer les frottis fixés et colorés par le May-Grünwald dans trois colorants différents :

1° On peut colorer dans une solution de Giemsa de la même façon que nous l'avons indiqué précédemment.

2° Avec le panchrome de Papenheim, qui donne une coloration beaucoup plus nette que le Giemsa.

Il est préférable d'utiliser la solution de panchrome très diluée (1 goutte pour 1 ou 2 centimètres cubes d'eau distillée) et de laisser agir pendant 24 heures. Avec la solution plus concentrée (3 ou 4 gouttes pour 1 centimètre cube), on obtient une

coloration moins élective, bien que beaucoup plus rapide (2 ou 3 heures).

3° Le meilleur colorant, dont nous nous sommes servi constamment au cours de nos recherches, est le bleu polychrome de Unna. Ce colorant donne des images très nettes — de même que le panchrome de Papenheim — et la coloration est déjà faite au bout de 5 à 10 minutes.

Nous utilisons toujours la solution de 9 à 10 gouttes de bleu de Unna dans 15 centimètres cubes d'eau de robinet.

Suivant l'espèce d'insecte sur lequel on a pris le sang, la concentration du colorant et le temps de coloration doivent être recherchés antérieurement. Après la coloration, on lave les frottis dans l'eau courante et on les sèche à l'air ou entre deux feuilles de papier filtre.

Pour colorer le bacille tuberculeux sur les frottis, nous les avons colorés à chaud, — après la fixation avec l'alcool méthylique, — avec la fuchsine phéniquée pendant quelques minutes et nous les avons différenciés avec l'acide sulfurique au cinquième.

Ensuite, nous avons traité les lames pendant quelques instants avec l'alcool absolu. Nous les avons lavées à l'eau et colorées ordinairement avec le bleu de méthylène.

Coupes. — L'analyse du sang faite seulement avec les frottis ne suffit pas pour étudier toutes les réactions d'immunité, comme par exemple la formation des cellules géantes, des capsules, des abcès, etc... et on est obligé de faire des coupes.

Le fixateur qui nous a donné de très bons et très constants résultats est le mélange de Duboscq-Brasil (ou Bouin alcoolique). La fixation de 24 heures est ordinairement suffisante pour les petits insectes, mais elle peut être prolongée sans aucun inconvénient 2 ou 3 jours.

Après la fixation, nous transportons les pièces fixées directement dans l'alcool à 80°.

M. MÉTALNICOV a conseillé comme fixateur le sublimé acidifié.

Solution saturée de sublimé . . . 95 cm³

Acide acétique. 5 cm³

Il a utilisé le fixateur bouillant. La fixation est déjà suffisante au bout d'une demi-heure. Il ne faut pas prolonger la

durée de fixation; car ce mélange peut modifier la structure des tissus.

Après la fixation, on lave pendant 24 heures les morceaux fixés dans l'alcool à 70°, auquel on a ajouté un peu de teinture d'iode.

Le mélange de Bouin donne aussi de très bons résultats.

Nous avons toujours fait l'inclusion à la paraffine, d'après la méthode couramment employée.

Pour colorer les coupes, nous avons utilisé le plus souvent le glyhémalun de Mayer — l'éosine, l'hématoxyline ferrique différencié avec la solution d'acide picrique, d'après la méthode de Masson et le bleu de méthylène.

Pour colorer les bacilles tuberculeux, nous avons coloré les coupes à froid avec la fuchsine phéniquée pendant 24 heures; puis nous les avons différenciées avec l'acide sulfurique au cinquième, et après nous les avons traitées par l'alcool absolu pendant quelques instants.

Nous avons différencié les coupes aussi avec le mélange suivant :

Alcool absolu	100 cm ³
Acide chlorhydrique	3 cm ³

Après lavage à l'eau, nous avons coloré les coupes avec le glyhémalun, ou tout simplement avec le bleu de méthylène.

Je ne donne que de très brèves indications sur les méthodes histologiques, car ce sont des procédés bien connus, et on peut les consulter dans n'importe quel traité de technique histologique, par exemple dans le livre si justement apprécié de M. LANGERON.

CHAPITRE II

IMMUNITÉ NATURELLE DES INSECTES

A. Immunité naturelle contre les microbes.

1° Quelques exemples d'immunité naturelle antimicrobienne.

— Les maladies des insectes sont encore très imparfaitement connues à l'heure actuelle. On les a étudiées surtout chez les insectes utiles (vers à soie, abeilles), ou chez les insectes très nuisibles (sauterelles, hannetons, *Lymantria dispar*, etc.).

Il est évident que chaque espèce a ses réceptivités.

On connaît des épizooties sévères qui sévissent parmi les insectes : les épidémies de sauterelles (*Schistocerca pallens*) provoquées par *Coccobacillus acridiorum* que d'HÉRELLE a observées en 1911 au Mexique ; la gattine, la pébrine et les différentes flacheries des vers à soie ; la loque européenne et américaine, les dysentéries, la nosema des abeilles, etc.

• Nous avons donné une liste de la bibliographie sur les maladies microbiennes des insectes nuisibles, dans l'un de nos travaux précédents, faits en collaboration avec M. MÉTALNICOV.

Mais, d'autre part, chaque espèce a ses immunités. METCHNIKOFF, en inoculant aux larves des *Oryctes nasicornis* différents microbes, a constaté que ces insectes sont réfractaires vis-à-vis de l'injection de grandes doses de bacilles charbonneux et de bacilles diphtériques. Par contre, ils sont très sensibles vis-à-vis du vibron cholérique.

KOVALEVSKY a démontré que le grillon champêtre est réfractaire à l'inoculation des bacilles tuberculeux aviaires, mais le *B. anthracis* les tue, même à une température assez basse (22 à 23°).

BALBIANI a constaté que plusieurs espèces d'insectes sont réfractaires vis-à-vis de microbes saprophytes appartenant au

groupe du *Bacillus subtilis*. Mais ce fut MÉTALNICOV qui étudia spécialement l'immunité naturelle chez les insectes. Depuis 1906, il a travaillé sur les chenilles de *Galleria Mellonella*, et il a démontré que cet insecte supporte, sans aucun signe de maladie, l'injection de doses massives de différents microbes, très pathogènes pour les animaux supérieurs : le bacille tuberculeux humain, bovin, aviaire, pisciaire ; le bacille paratuberculeux, b. diphtérique, streptocoque, peste, tétanos, etc.

Par contre, ces chenilles ne supportent qu'à des doses peu fortes l'injection d'autres microbes : staphylocoque doré, charbon, vibrion septique, gonocoque, choléra des poules, b. dysentérique, bacille typhique et paratyphique A. et B.

Mais les chenilles de *Galleria* se sont montrées extrêmement sensibles vis-à-vis de divers microbes saprophytes ; parfois l'inoculation les tue, même à une dose infiniment petite.

Parmi les microbes de ce groupe, on peut citer : *B. anthracoides*, *B. coli*, *B. subtilis*, *Vibrio metchnikovi*, *Proteus* n° 19, *B. alvei*, *Coccobacillus acridiorum*, etc.

Comme CANTACUZÈNE le fait remarquer : « cette sorte d'antimonie, que nous constatons envers la virulence des germes adaptés aux organismes supérieurs, et celle de microbes pathogènes pour les Invertébrés, exprime sous une forme saisissante, à quel point les conditions humérales diffèrent dans l'une et l'autre de ces catégories d'êtres ».

MÉTALNICOV, en collaboration avec Mme TOUMANOFF et Mlle KOSTRITSKY, a étudié l'action de *Bacterium tumefaciens* de Erwin SMITH sur les chenilles de *Galleria*, et il a établi qu'à la température du laboratoire, ce microbe est très pathogène pour cet insecte, tandis qu'à la température de 37° il l'est beaucoup moins. Ce fait ne s'explique-t-il pas par une propriété biologique du microbe en question, car la température optimale pour son développement est environ de 25° à 30° ?

Avec le *Bacterium tumefaciens radiculicola*, ces auteurs, contrairement à ce qu'ils ont obtenu pour le premier microbe, ont établi que le *B. tumefaciens radiculicola* est très pathogène à la température de 37°, et presque inoffensif à la température de laboratoire.

L'année dernière, nous avons étudié en collaboration avec M. MÉTALNICOV l'immunité naturelle chez les chenilles de la

Pyrale du Mais. Le bacille tuberculeux humain injecté à des doses extrêmement fortes ne provoque aucun signe de maladie; de même que le bacille tuberculeux pisciaire. Le microbe de DANYSZ, et le *B. galleriæ* n° 1 Mét. et Chor., qui sont assez pathogènes pour les chenilles de *Galleria*, ne sont mortels qu'injectés à des doses massives.

Au contraire que l'inoculation de *Coccobacillus ellingeri* Mét. et Chor., *Vibrio leonardi* M. et Ch., *Bacterium canadensis* M. et Ch., *B. sotto* Ischiwata est extrêmement dangereuse; les microbes les plus pathogènes sont le *B. galleriæ* n° 2 M. et Ch., et le *B. thuringiensis* Berliner, qui appartiennent tous les deux au groupe de *Bacterium megatherium*. Quelques microbes introduits dans le sang de cet insecte suffisent pour provoquer la mort.

MÉTALNICOV et TOUMANOFF ont démontré que les bacilles lépreux sont inoffensifs pour les chenilles de *Galleria* et pour les phasmides. TOUMANOFF, en injectant le bacille tuberculeux aux phasmides (*Carausius morosus* Br. et Redt.), constata qu'il ne provoque pas la mort des insectes, et qu'en quelques mois ils sont tous digérés par les leucocytes. Cependant la destruction des bacilles tuberculeux par le phasmide est beaucoup plus lente que par *Galleria mellonella*. Six mois après l'injection, l'auteur a trouvé sur les coupes, un grand nombre de bacilles encore acido-résistants.

Nous allons étudier plus loin comment les différents insectes agissent contre les bacilles tuberculeux.

On peut distinguer, chez les insectes comme chez les animaux supérieurs, l'immunité naturelle absolue, comme par exemple, la résistance des chenilles de *Galleria* aux injections des bacilles tuberculeux humains, et d'autre part, l'immunité naturelle relative, où les insectes résistent à la dose faible de ces microbes, mais sont tués par la dose forte, comme par exemple, l'immunité des chenilles de *Galleria* contre le vibrion cholérique, le staphylocoque, etc... Enfin, contre certains microbes, l'immunité n'existe pas du tout.

2° *Variation de la résistance des insectes aux différents stades du développement.* — Nous savons que les organismes de même espèce, mais d'âges différents, se comportent parfois diversement à l'égard d'un même germe : les jeunes cobayes ou les

lapins sont plus sensibles au charbon et au pneumocoque que les plus âgés, etc...

En ce qui concerne les insectes, METCHNIKOFF et BALBIANI ont remarqué déjà que ceux dont le sang est riche en phagocytes (grillons, *Oryctes* et d'autres Orthoptères) accusent une immunité plus forte en général que les insectes qui n'ont que peu de leucocytes, comme les papillons, les mouches, les Hyménoptères.

CHIGASSAKI a étudié la résistance de *Galleria mellonella* à différents stades du développement en déterminant la dose minima mortelle du bacille de DANYSZ pour les chenilles, pour les chrysalides et pour les papillons.

Les chenilles, avant la métamorphose, deviennent plus sensibles que les chenilles plus jeunes. Au moment de se transformer en nymphes, elles deviennent à peu près dix fois plus sensibles; les chrysalides sont 125 fois plus sensibles que les chenilles, et les papillons le sont quatre ou six fois.

Mais d'autre part, MÉTALNICOV a démontré que la mite des abeilles est douée d'immunité naturelle absolue contre la tuberculose dans tous les stades de sa vie, ainsi qu'au moment de sa métamorphose; l'âge de l'insecte ne joue donc ici aucun rôle appréciable.

3° *Variation individuelle de la résistance contre les microbes.* — Parmi les individus de même espèce et de même âge, il existe à l'égard des virus des différences de sensibilité, parfois assez considérables: les glossines, qui sont parasitées par les trypanosomes, ne présentent pas toutes un terrain propice à l'évolution du parasite.

De même, il arrive souvent que parmi une dizaine de chenilles de *Galleria* inoculées avec une dose minima mortelle d'un microbe quelconque, une ou parfois deux survivent à l'infection.

4° *Variation de résistance des espèces différentes d'insectes vis-à-vis d'un même microbe.* — D'une espèce d'insectes à l'autre, la résistance varie sensiblement vis-à-vis d'un parasite déterminé; mais, par contre, il est évident qu'une espèce de microbes peut être pathogène pour les différentes espèces d'insectes.

D'après CHATTON, le *Coccobacillus acridiorum* (d'Hérelle) qui

est extrêmement virulent pour les sauterelles et d'autres insectes (hannetons, fourmis, chenilles diverses) est presque inoffensif pour le ver à soie.

Dernièrement, nous avons trouvé une microsporidie appartenant au genre *Telehania*, parasite des chenilles de *Vanessa urticæ* L. Les spores du parasite, ajoutées à la nourriture des chenilles du *Vanessa*, suffisent pour provoquer une infection générale dans 50 0/0 des cas.

Les amibes qui sortent des spores passent dans le sang, et se fixent principalement dans les corps adipeux ou se développent dans le plasma sanguin. Si on injecte ces spores dans le sang des chenilles de *Galleria*, on voit bien qu'au bout de 24 à 48 heures les spores rejettent leur filament polaire, les amibes commencent à sortir des spores et à se diviser ; mais bientôt elles sont toutes phagocytées et digérées par les leucocytes des chenilles.

Ce fait se rapproche beaucoup de celui observé par M. DUBOSQ pour les sporozoïdes d'*Aggregata eberthi*, qui peuvent infecter *per os* toutes les espèces de *Portunus*, sauf le *Portunus puber*. Chez cette espèce, les sporozoïdes qui passent dans le sang sont phagocytés et détruits dans le tissu conjonctif péri-intestinal.

La bactérie que nous avons isolée des chenilles d'*Ephestia* (*B. thuringiensis* Ber.), est très pathogène pour plusieurs espèces de Lépidoptères et les infecte *per os* (*Ephestia kühniella* Zell, *Pyrausta nubilalis* Hbn, *Galleria mellonella* L., *Lymantria* (*Porthetria*) *dispar* L., *Vanessa urticæ* L., *Aporia crataegi* L.), mais ce microbe n'infecte pas la voie buccale ni les coléoptères *Bruchus* (*Acanthoscelides*) *obtectus* Say ; ni les moustiques (*Anopheles maculipennis* Mg, et *Culex pipiens* L.) ; ni les sauterelles (*Chortippus pulvinatus* F. W. *Chortippus dorsatus* Zell, *Stauroderus biguttulus* L., et *Calliptamus italicus* L. (MÉTALNICOV et CHORINE).

5° *Infection des insectes per os*. — La plupart des insectes s'infectent très difficilement par la voie intestinale, même avec les microbes très pathogènes.

Les microbes ingérés sont tués par les sécrétions de l'intestin, ou bien la paroi de l'intestin présente un obstacle infranchissable pour eux.

Pour provoquer une maladie mortelle chez les insectes, le

microbe doit passer presque toujours dans la cavité générale du corps, et à part des cas exceptionnels (gattine de ver à soie), la septicémie termine toujours l'infection microbienne et provoque la mort de l'insecte.

Mais certaines espèces d'insectes sont plus sensibles à l'infection par la voie intestinale : comme l'a montré d'HÉRELLE pour les différentes espèces de sauterelles, qui s'infectent facilement, par la voie intestinale, avec le *Coccobacillus acridiorum*. Les vers à soie contractent la gattine en ingérant le *Streptococcus bombycis* Flugge. Il en est de même pour les abeilles avec le *B. larvæ* White.

Les chenilles de la Pyrale du Maïs s'infectent facilement *per os*, avec les divers microbes que M. MÉTALNICOV et moi avons isolés des insectes (*Bact. galleriæ* n° 2, *B. canadensis*, *Coc. ellingeri*, *Vibrio leonardi*, *B. thuringiensis* Ber., etc...). Tandis que les chenilles de *Galleria* ne s'infectent qu'avec le *B. thuringiensis* Ber.; et avec les cultures de *B. galleriæ* n° 2, récemment isolées de ces chenilles.

6° *Facteur microbe*. — Le facteur microbe joue un rôle très important. La virulence peut s'atténuer ou s'exalter, suivant les conditions extérieures.

A) Culture sur les milieux artificiels. — Plusieurs races de microbes très pathogènes perdent de leur virulence en culture sur les milieux artificiels.

Nous avons indiqué déjà le cas de *B. galleriæ* n° 2.

Isolé des chenilles, ce microbe peut infecter les chenilles de *Galleria* par la voie intestinale, mais au bout de quelques passages sur la gélose, il perd complètement cette faculté.

D'HÉRELLE a fait des observations analogues pour le *Coccobacillus acridiorum* isolé de criquets (*Schistocerca pallens*) par lui en 1911, et qui, cultivé sur la gélose, perdait au bout de quelques passages la propriété d'infecter *per os* les sauterelles.

La composition du milieu de culture a une importance considérable.

Nous avons étudié spécialement l'influence de l'acidité du milieu sur la virulence d'un Coccobacille isolé par MÉTALNICOV et moi, des chenilles de la Pyrale du Maïs, que nous avons désigné sous le nom de *Coccobacillus ellingeri*. La mortalité des chenilles, quand on les contaminait *per os* avec ce microbe, ne

dépassait pas généralement 60 0/0 dans nos premières expériences.

Pour augmenter la mortalité des chenilles, nous avons essayé d'exalter la virulence de notre microbe, et nous avons étudié, en premier lieu, l'influence de la concentration ionique du milieu de culture.

Comme milieu de culture, nous avons utilisé le bouillon de viande peptoné, ajusté à différents pH, depuis le pH 6,5 jusqu'au pH 8,2, à intervalle de 0,3 ou 0,4. La détermination de concentration en ions a été faite d'après la méthode colorimétrique de MICHAELIS.

Toutes les expériences ont été exécutées à la température de 30°, et la culture du microbe s'est toujours développée à cette température.

Dans cet ordre d'idées, nous ne citerons qu'une des expériences qui ont été faites sur plus de 450 chenilles de *Pyrausta*.

Expérience n° 6 du 5 décembre 1927. — Huit lots de morceaux de tige d'armoise commune (*Artemisia vulgaris*) ont été mouillés par les cultures de 24 heures du Coccobacille de *Pyrausta* en bouillon peptoné ordinaire à différents pH. Chaque lot a été mis dans un bocal avec 10 chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hübn (les cultures pures du microbe qui ont servi à infecter les chenilles ont été obtenues en ensemençant sur la gélose le sang des chenilles malades ou mortes).

Nous avons obtenu les résultats suivants :

Richesse de développement de la culture	pH	Après 48 heures	Après 6 jours
++++	1° pH = 6,5	2 mortes ; 8 vivantes	0 morte ; 8 vivantes
++++	2° pH = 6,7	2 mortes ; 8 vivantes	0 morte ; 8 vivantes
++++	3° pH = 7,0	3 mortes ; 7 vivantes	3 mortes ; 4 vivantes
++++	4° pH = 7,2	10 mortes ; 0 vivante	— 0 vivante
+++(+)	5° pH = 7,6	3 mortes ; 7 vivantes	1 morte ; 6 vivantes
+++	6° pH = 7,9	1 morte ; 9 vivantes	0 morte ; 9 vivantes
+++	7° pH = 8,2	0 morte ; 10 vivantes	0 morte ; 10 vivantes
	8° Bouillon stérile	0 morte ; 10 vivantes	0 morte ; 10 vivantes

C'est cette expérience qui a donné les résultats les plus démonstratifs.

Si nous prenons les chiffres moyens de toutes nos expériences, nous obtenons les résultats suivants :

La culture faite dans le bouillon à pH 6,5 fait mourir 65,2 0/0 des chenilles.

—	—	7,0	—	81,5	—
—	—	7,2	—	90,0	—
—	—	7,6	—	76,3	—
—	—	7,9	—	57,5	—
—	—	8,2	—	54,5	—

Ces chiffres nous montrent que la virulence des microbes varie sensiblement dans une zone de pH assez limitée ; mais ce n'est pas la conséquence d'une différence de développement, car depuis le pH 6,5 jusqu'au pH 7,6, il ne varie pas d'une façon appréciable.

Ces expériences ont été dernièrement confirmées par B. HUSZ, à Budapest, qui a étudié l'influence de l'acidité du milieu sur le *B. thuringiensis* Ber.

D'après les travaux de GROER, d'ART et d'autres auteurs, nous savons quelle est l'influence de la concentration ionique du milieu de la culture sur la production de toxine par le bacille diphtérique. Mais notre microbe ne forme pas de toxine soluble : 0,01-0,02 de centimètre cube des cultures de 1 à 10 jours filtrées à travers une bougie de L. 2 injectés dans le sang, ne causent aucun dommage aux chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hbn, ni aux chenilles de *Galleria mellonella* L. Donc le changement de virulence ne dépend pas ici de ce facteur.

Les résultats négatifs obtenus par plusieurs auteurs (PAILOT, WHITE, CHATTON, VICHER, etc.) qui ont essayé d'infecter des insectes de différentes espèces *per os* par divers microbes virulents, ne peuvent-ils pas s'expliquer partiellement par le fait décrit ci-dessus ?

b) Passages. — On sait, d'après de nombreuses expériences chez les vertébrés, que les passages de microbes par l'organisme d'individus appartenant à une même espèce augmentent ordinairement leur virulence vis-à-vis de cette espèce.

Chez les Invertébrés, les expériences analogues sont beaucoup moins nombreuses, et les résultats obtenus par différents auteurs ne sont pas concordants.

D'HÉRELLE, SERGENT et LÉRITHIER ont démontré que les passa-

ges exaltent sensiblement la virulence de *Coccobacillus acridiorum*, et tous les investigateurs ont employé constamment ce procédé de passage pour en exalter la virulence, lors de l'application pratique dans la lutte contre les sauterelles et contre les staurontes. PAILLON a obtenu des résultats moins décisifs par le même procédé.

M. MÉTALNICOV et moi, nous avons fait des expériences sur les passages de *Coccobacillus ellingeri* Mét. et Chor. et de *B. galleriæ* n° 2, Mét. et Chor.

Les passages ont été faits par des chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hbn : les chenilles ont été infectées par piqûre sous-cutanée, avec le bout effilé d'un tube capillaire en verre.

Nous avons infecté les chenilles l'une après l'autre, sans isoler les microbes sur les milieux artificiels.

Nous avons poursuivi les passages pendant tout l'hiver jusqu'au mois de juin, nous en avons fait 86.

La mortalité des chenilles infectées par le *Coccobacillus ellingeri* avec la souche initiale et les cultures, après 12, 30 et 50 passages, n'est pas sensiblement changée, peut-être parce que la souche initiale était déjà extrêmement virulente ; mais ce procédé est un très bon moyen pour conserver la virulence fragile de ce microbe.

7° *Variations de virulence suivant la souche d'un même microbe.* — Il existe des microbes dont toutes les souches sont douées d'une virulence très forte vis-à-vis d'un insecte donné. Comme, par exemple, les différentes souches de *B. thuringiensis* Berl. dont nous en possédons 9, sont toutes extrêmement pathogènes pour les chenilles de la Pyrale du Maïs et pour les chenilles de *Galleria*, de même que deux souches de *B. Galleriæ* n° 2, Mét. et Ch.

Au contraire, il existe des microbes dont toutes les souches sont complètement inoffensives pour un insecte, comme par exemple, d'après MÉTALNICOV, le sont toutes les souches de bacilles tuberculeux pour les chenilles de la mite des abeilles.

Cependant, le plus souvent, les diverses souches d'un microbe sont douées d'une virulence très différente pour un insecte donné. Un exemple démonstratif nous est donné par les bacilles dysentériques, il existe des souches de ce microbe

complètement inoffensives, et, d'autre part, des souches très pathogènes pour les chenilles de *Galleria mellonella* L.

MÉTALNICOV, qui étudia beaucoup l'immunité naturelle chez les chenilles de la mite des abeilles, donne dans ces travaux maints exemples : *bacterium coli*, bacille typhique et paratyphique, vibrion de choléra, staphylocoque, etc.

Ordinairement, cette différence de la virulence varie dans les plus grandes limites.

8° *Action pathogène des microbes sur les insectes.* — MÉTALNICOV a fait des expériences très intéressantes en infectant les chenilles de *Galleria* avec les différents microbes tués par la chaleur.

Il a démontré que tous les microbes très pathogènes pour les chenilles de *Galleria*, les tuent, par les endotoxines qu'ils contiennent.

Les *b. coli*, *b. typhique* et paratyphiques A. et B., *b. pyocyanique*, *b. prodigiosus*, etc., tués et injectés, même à des doses faibles font mourir les chenilles.

Cette sensibilité des chenilles de *Galleria* explique un fait très intéressant observé par MÉTALNICOV.

Si on injecte les chenilles avec les cultures de microbes très virulents, on voit sur les frottis du sang que la phagocytose est très faible (choléra Pot.), et que les microbes injectés se multiplient rapidement dans le corps des insectes, envahissant tous les organes internes.

L'évolution de la maladie est toute autre si la chenille est contaminée avec des cultures peu virulentes (choléra S., certaines sarcines et différents staphylocoques).

Après l'injection des fortes doses de ces microbes, on voit sur les frottis du sang que la phagocytose est très intense ; pour le vibrion du choléra S, on observe aussi le phénomène Pfeiffer très intense au bout de 2 ou 3 heures.

Les réactions de défense sont tellement actives que quelques heures après l'injection des microbes, ils sont phagocytés ou bactériolysés, mais cependant les chenilles meurent au bout de 20 à 48 heures. Le sang des chenilles mortes est stérile, car tous les microbes sont détruits.

Les insectes meurent d'intoxication par les endotoxines libérées au cours de la destruction des microbes.

B. Immunité naturelle des insectes contre les poisons solubles.

1° *Partie historique.* — Jusqu'à ces derniers temps, on a considéré que les invertébrés, et les insectes en particulier, sont complètement réfractaires vis-à-vis des toxines microbiennes solubles. Ces toxines proviennent de microbes pathogènes pour les animaux supérieurs, et il n'est pas extraordinaire que les invertébrés se soient montrés en général très résistants vis-à-vis de ces poisons, car parmi les animaux supérieurs, on peut citer des cas d'immunité naturelle assez forte vis-à-vis des toxines : les poules sont très résistantes au poison tétanique ; les rats et les souris, à la toxine diphtérique. Il est certain que si l'on faisait des recherches spéciales, on trouverait beaucoup plus de poisons bactériens solubles agissant sur les invertébrés. Le travail d'AOKI et CHIGASSAKI le prouve.

METCHNIKOFF a démontré que les araignées et les scorpions (*Scorpio afer* et *Androctonus occitanus*) sont insensibles à la toxine tétanique. Les scorpions sont insensibles à leur propre venin, qui est, d'après BOURNE, très toxique pour les araignées, et les insectes.

Cette immunité des scorpions s'explique par le fait constaté par METCHNIKOFF, que leur sang est doué d'un pouvoir antitoxique incontestable.

Parmi les divers Echinodermes, on connaît des cas d'immunité naturelle contre les poisons solubles. C'est ainsi que les holothuries, étoiles de mer, sont insensibles au poison des pédicellaires d'oursin.

En ce qui concerne les insectes, METCHNIKOFF a démontré que les larves de *Oryctes nasicornis* et le grillon champêtre sont résistants à l'injection à forte dose de toxine tétanique.

MÉTANILCOV a fait des expériences analogues avec les chenilles de *Galleria mellonella* L. Il est arrivé à conclure, que cet insecte est complètement résistant vis-à-vis de la toxine diphtérique, et de la toxine tétanique, de même que vis-à-vis des filtrats des cultures des microbes les plus virulents pour le *Galleria* (protéus, subtilis, anthracoides), mais ces chenilles se sont montrées extrêmement sensibles au venin de cobra et à la bile. Ces substances, injectées même à dose très faible, tuent

les chenilles en quelques secondes, et elles ne doivent pas être comparées avec les vraies toxines microbiennes, dont l'action commence toujours à se manifester au bout de quelques heures, ou même de quelques jours.

Les larves et les mouches adultes (*Lucilia cæsar*) sont résistantes vis-à-vis de la toxine botulinique. SAUNDERS, en 1913, a remarqué que la maladie des poules, connue en Amérique sous le nom de « limberneck » survient chez les poules ayant ingéré des larves de *Lucilia cæsar*.

DICKSON (1917), WILKINS et DUTSCHER (1920) ont rapproché le tableau clinique de cette maladie de celui du botulisme, mais c'est BENGSTON qui, en 1922, a apporté des preuves décisives en isolant des larves de *Lucilia* le *Bacterium botulinus* C. Les larves de cette mouche en se développant dans les cadavres infectés avec le *B. botulinus*, ingèrent ces microbes, qui commencent à se développer dans l'intestin des larves et produisent la toxine, qui n'est pas nocive pour cet insecte ; mais ces larves, avalées par les poules, les intoxiquent. Les mouches, issues des larves infectées, restent très toxiques pour les poules. Il est évident que la toxine élaborée pendant la vie larvaire par *Lucilia* reste très longtemps inabsorbée par l'organisme de l'insecte, comme METCHNIKOFF l'a remarqué pour la toxine tétanique qui reste pendant plusieurs semaines dans le sang des *Oryctes nasicornis*, sans perdre sa toxicité. BISHOP a démontré que le *Chrysomyia macellaria* qui se développe dans les cadavres, de même que le *Lucilia cæsar*, peut être porteur de b. botulinique et peut transmettre le « linberneck » aux oiseaux.

Mais aujourd'hui, nous connaissons les toxines bactériennes solubles qui ont une action nocive pour les insectes. C'est ainsi qu'en 1915 AOKI et SCHIGASSAKI ont démontré que le *Bacillus sotto* (Ischiwata) produit une toxine soluble qui agit sur le ver à soie, même quand elle est absorbée avec la nourriture.

Les chenilles nourries avec des feuilles mouillées avec la toxine périssent en peu de temps.

PAILLOT, en 1919, a remarqué chez les chenilles *Euproctis chrysorrhœa* L. et *Malacosoma neustria*, une réaction des cellules spécifiques après qu'on leur a injecté le filtrat de culture de *B. melolonthæ liquefaciens* γ. L'auteur a observé que cette

réaction se produit seulement chez les chenilles de ces deux espèces. Mais ici la toxicité du filtrat est presque nulle et nous savons que la plupart des corps étrangers introduits dans le sang des animaux déclenchent une réaction leucocytaire plus ou moins forte, et il est impossible de considérer le filtrat de ce microbe comme une vraie toxine.

TOUMANOFF, en 1929, étudia la toxicité de divers champignons pour les abeilles. D'après lui, les filtrats stériles (passés à la bougie de Chamberland), d'*Apsergillus flavus* Link sont extrêmement toxiques pour les abeilles adultes *per os*; la présence et la multiplication du champignon seulement dans la lumière du tube digestif de l'abeille suffisent pour provoquer l'intoxication mortelle de l'insecte.

2° *Partie expérimentale.* — Nous avons repris les expériences de MÉTANILCOV, et nous avons obtenu des résultats presque concordants. Les filtrats des cultures de microbes extrêmement pathogènes, comme par exemple le *Bacterium galleriæ* n° 2, Mét. et Chor., *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle sont complètement inoffensifs pour les chenilles de *Galleria*, de même que la toxine tétanique.

Les chenilles injectées avec ces substances et maintenues à la température de 37° ou à celle du laboratoire continuent à se développer normalement et donnent des papillons normaux, en même temps que chez les chenilles témoins.

a) *Toxine tétanique.* — Je citerai une de mes expériences faites avec la toxine tétanique (1).

Expérience faite le 11 décembre 1928. — 30 Chenilles de *Galleria* ont été inoculées le 17 décembre avec 1/50 de centimètre cube de toxine tétanique fraîche, dont la dose mortelle pour le cobaye de 300 grammes est environ 1/15 000 de centimètre cube.

3 jours après, aucune des chenilles inoculées n'a été malade et trois d'entre elles se sont transformées en chrysalides.

Toutes ces chenilles sont restées bien portantes et ont donné des papillons tout à fait normaux (Expérience faite à la température de 37°).

Les chenilles de *Galleria* ne sont nullement endommagées par les injections répétées de la toxine.

(1) Je suis heureux de remercier M. le Prof. LOISEAUX, qui nous a fourni toutes les toxines pour nos expériences.

Après avoir reçu la toxine deux ou trois fois à la dose de 0, cm³ 02, elles continuent leur développement normalement.

Les chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hbn sont aussi tout à fait insensibles aux injections de la toxine tétanique, même répétées à des doses énormes (0,02 de cm³).

Expérience faite le 18 décembre 1928. — 30 Chenilles de *Pyrausta* ont reçu 1/100 de centimètre cube de toxine tétanique (la même que dans l'expérience précédente).

Le 6 février 1929, aucune des chenilles ne présentait de signes de maladie. Les chenilles ont été conservées à la température du laboratoire (20-22°), car elles ne supportent pas bien la température plus élevée.

Ensuite ces chenilles ont été portées dans une atmosphère humide (comme M. ROUBAUD l'a démontré, l'état hygrométrique de l'air a une importance particulière sur la métamorphose de *Pyrausta*).

Vers le mois d'avril, la plupart d'entre elles se sont transformées en nymphes qui, au bout de quelques semaines, ont donné des papillons tout à fait normaux.

b) Toxine diphtérique. — La toxine diphtérique est beaucoup plus toxique pour ces deux espèces d'insectes.

Les chenilles de *Pyrausta* inoculées avec 1/100 de centimètre cube de la toxine deviennent malades et la plupart d'entre elles meurent au bout de un ou deux mois (la dose mortelle de cette toxine pour un cobaye est environ 1/500 de centimètre cube).

La période d'incubation est très prolongée chez les chenilles de *Pyrausta* : un ou deux mois à la température de 20°. Les injections répétées de toxine raccourcissent sensiblement la période de l'incubation et donnent une mortalité beaucoup plus élevée.

Je vais citer deux de mes expériences faites le 25 septembre 1928.

Expérience n° 1. — 30 Chenilles de *Pyrausta* ont été inoculées avec 0 cm³ 01 de la toxine diphtérique.

Le 20 octobre, toutes les chenilles inoculées étaient bien portantes.

Le 30 octobre, 6 chenilles inoculées étaient mortes.

Le 7 novembre, 9 autres étaient trouvées mortes.

Les autres chenilles inoculées restaient bien portantes.

Parmi les chenilles témoins normales, qui étaient en même nombre que les chenilles en expérience, 5 sont mortes pendant cette période.

Expérience n° 2. — 30 Chenilles de *Pyrausta* ont été inoculées avec 0,01 de centimètre cube de la toxine diphtérique.

Le 27 septembre, toutes les chenilles étaient vivantes, ainsi que toutes celles qui avaient été inoculées encore une fois avec 1/100 de centimètre cube de la toxine diphtérique.

Le 20 octobre, 18 chenilles inoculées sont mortes.

Le 6 octobre, 6 chenilles sont trouvées mortes.

6 chenilles ont survécu à l'injection.

Parmi les 30 chenilles témoins, qui ont été conservées dans des conditions identiques, 6 sont mortes.

De ces observations, il ressort que bien que les chenilles de *Pyrausta* aient une certaine sensibilité envers la toxine diphtérique, elles offrent comparativement aux animaux supérieurs une résistance remarquable vis-à-vis de cette toxine.

Nous avons étudié particulièrement l'action de la toxine diphtérique sur les larves de *Galleria mellonella* L. Ces chenilles sont plus sensibles vis-à-vis de cette toxine que celles de *Pyrausta nubilalis* Hbn. 1/500 de centimètre cube de la toxine diphtérique fraîche les tue au bout de 20 à 40 jours. Cette dose est à peu près égale à une dose minima mortelle pour un cobaye de 300 grammes. La période d'incubation est ici très longue, mais cependant un peu plus courte que pour les chenilles de *Pyrausta*. Des inoculations répétées de fortes doses de toxine raccourcissent sensiblement l'incubation. Deux injections de 0 cm³ 02 de la toxine à l'intervalle de deux jours font mourir les chenilles au bout de 24 à 48 heures, après la deuxième injection.

La température n'a pas une grande influence sur la période d'incubation, comme il résulte d'une de nos expériences citée ci-dessous.

Dans le cas où les chenilles ont été inoculées une fois avec 0,01 de centimètre cube de la toxine, les premiers signes apparents de la maladie commencent à apparaître au bout de 5 ou 6 jours : les chenilles deviennent plus lentes et des petites taches noires apparaissent sur la chitine ; d'abord rares, elles deviennent très nombreuses en quelques jours.

Les coupes nous ont montré que ces taches ne sont autre chose que des lésions locales de la chitine. D'abord, la chitine commence à se détruire dans la partie la plus profonde, ensuite la lésion s'étale progressivement sur les couches supérieures. L'hypoderme reste toujours intact, même chez les chenilles mourantes.

Ici je citerai quelques-unes de nos expériences faites dans cet ordre d'idée.

Expérience n° 1 faite à la température de 37° le 10 janvier 1929. — 10 chenilles reçoivent 0 cm³ 01 de la toxine diphtérique fraîche.

Le 1^{er} février, toutes les chenilles sont mortes.

Les chenilles témoins se sont toutes transformées en chrysalides.

Expérience n° 2 faite à la température du laboratoire le 10 janvier 1929. — 10 chenilles reçoivent 0 cm³ 01 de la toxine diphtérique (la même que dans l'expérience précédente).

Le 21 janvier, toutes les chenilles sont malades, comme dans l'expérience n° 1.

Le 1^{er} février, 6 chenilles sont mortes.

Le 3 février, 2 autres chenilles sont mortes.

Le 5 février les deux dernières chenilles ont été trouvées mortes.

Les chenilles témoins se sont toutes transformées en chrysalides.

Expérience n° 3 faite le 25 septembre 1929. — 10 chenilles de *Galleria* reçoivent 0,01 cm³ de la toxine diphtérique.

Le lendemain, les chenilles ne présentent aucun signe de maladie, et elles ont reçu à nouveau 0 cm³ 02 de la toxine.

Le 27 septembre, 4 des chenilles inoculées ont été trouvées mortes.

Les autres chenilles sont mortes un jour plus tard.

Quelles lésions produit la toxine diphtérique chez les chenilles?

Nous avons étudié le sang des chenilles inoculées par la toxine diphtérique. Pendant les deux jours qui suivent l'inoculation de 0 cm³ 01 de la toxine, les amibocytes restent normaux. Au bout de 3 à 5 jours, des granulations acidophiles très fines apparaissent dans les amibocytes, et particulièrement dans les micronucléocytes. Il est probable que ces granulations sont dues à la transformation de la toxine absorbée par les leucocytes, comme METCHNIKOFF l'a cru.

Ensuite les leucocytes commencent à dégénérer. Dans le plasma de toutes les cellules sanguines, même chez les œno-cytoïdes, les petites vacuoles se forment. Ces vacuoles deviennent de plus en plus nombreuses et de plus en plus grandes, et finalement les cellules se désagrègent complètement.

Le sang des chenilles mortes est d'une couleur noirâtre, à cause de l'oxydation, très pauvre en éléments figurés et très toxique à l'injection pour les chenilles normales.

Nous avons mentionné déjà les lésions de la chitine à la suite de l'injection de la toxine diphtérique.

Il y a encore une chose intéressante à mentionner : les chenilles injectées par une dose minima mortelle de la toxine ne se transforment jamais en chrysalides. Si nous prenons les chenilles qui doivent se transformer au bout de quelques jours en chrysalides, et si nous inoculons la moitié de ces chenilles avec une dose minima mortelle de la toxine, nous voyons que les chenilles non inoculées se transforment en chrysalides, et puis en papillons en deux semaines, tandis que les chenilles inoculées restent à ce stade du développement un mois, même un mois et demi, et ainsi jusqu'à leur mort.

Comment peut-on expliquer que les chenilles inoculées avec la toxine ne soient plus capables de se transformer en nymphes ?

Depuis les travaux de CONTE et VANÉY, et surtout d'après ceux de KOPEC sur les chenilles de *Lymantria* (*Porthetria*) *dispar* L., on sait de quelle importance sont l'intégrité du système nerveux et surtout des ganglions cervicaux pour la métamorphose des insectes.

METALNICOV et KORVINE-KROUNOVSKY ont fait des expériences dans cet ordre d'idées sur les chenilles de *Galleria* et sont arrivés à des conclusions analogues.

Il est très vraisemblable que la toxine agisse sur le système nerveux des chenilles, de telle sorte que l'évolution de l'insecte est interrompue.

Il est probable aussi que la toxine a une action nocive sur les disques imaginaux de la chenille. Dans tous les cas, l'intoxication doit être considérée comme générale, si le sang dans lequel baignent tous les organes est contaminé.

CHAPITRE III

IMMUNITÉ ACQUISE ENVERS LES MICROBES CHEZ LES INSECTES

A. — Immunité active.

1^o *Partie historique.* — Existe-t-il une immunité acquise chez les invertébrés ?

On sait, d'après les nombreux travaux de STAHL, METCHNIKOFF, CZERNY, ROSE, MASSART, HENNEGUY, BALBIANI, YASUDA, WOODRUFF, DANIEL, etc... que les différents protozoaires peuvent s'habituer progressivement à vivre dans un milieu qui serait nocif ou même mortel pour les animaux qu'on y transporterait directement de leur milieu habituel.

On a souvent constaté l'apparition de races résistantes de trypanosomes et de spirochètes vis-à-vis de certaines drogues, lors du traitement des malades, mais il est impossible de savoir avec certitude s'il s'agit ici d'immunité acquise, ou de mutations, rendant les individus plus résistants envers des conditions défavorables.

METCHNIKOFF, avec les larves d'*Oryctes nasicornis*, KOVALEVSKY, avec les scolopendres, n'ont pas pu réussir à immuniser ces animaux contre le charbon.

CANTACUZÈNE a réussi à immuniser les *Sipunculus* et certaines espèces de Crustacées décapodes marins contre les injections de doses mortelles de microbes.

METALNICOV, dans une série de travaux des plus intéressants, a beaucoup étudié et démontré l'immunité acquise chez les insectes, principalement chez les chenilles de *Galleria mellonella*.

PAILLOT a pu immuniser les chenilles d'*Agrotis* contre des doses mortelles de *Bacillus mololonthæ non liquefaciens*.

Cet auteur a étudié les réactions de l'immunité chez les

insectes, et nous allons en discuter les conclusions dans un des chapitres suivants.

D'autre part, nos connaissances sur l'immunité des insectes ont été développées par les travaux des Professeurs A. Ch. HOLLANDE et de ses élèves MM. VICHER et AGHAR, par le savant américain GLASER, et par les élèves de M. METALNICOV, KATADJIMA, CHIGASSAKI, ISCHIMORI, TATEIVA, TOUMANOFF, ZERNOFF, etc., etc...

2° *Méthode d'immunisation.* — a) Microbes chauffés à 60°.

METALNICOV a démontré que l'injection des microbes tués ou affaiblis par la chaleur (ordinairement 30 minutes à la température de 58° à 60°) immunise très bien les chenilles contre le microbe correspondant.

Ce procédé très simple donne de très bons résultats avec plusieurs espèces de microbes et c'est pour cette raison que : ISCHIMORI, CHIGASSAKI, AGHAR, GLASER, PAILLOT, HOLLANDE, TOUMANOFF, ZERNOFF et moi-même, avons presque toujours utilisé au cours de nos recherches ce mode d'immunisation.

b) Dose minima de culture jeune. — METALNICOV a réussi à immuniser les chenilles de *Galleria* en les injectant avec les doses minimales de cultures jeunes virulentes.

c) Cultures vieilles. — METALNICOV et PAILLOT ont pu immuniser les insectes par inoculation d'une vieille culture.

d) Bactériophage. — METALNICOV a démontré que l'injection de bactériophage anti-dysentérique préserve les chenilles de *Galleria* contre la dose mortelle du microbe de Shiga, même injecté peu après l'inoculation des chenilles, le bactériophage peut avoir une action curative.

e) Culture asporogène. — Contre certaines espèces de microbes, les insectes ne s'immunisent que très difficilement, et dans ce cas, il faut chercher des procédés spéciaux.

C'est ainsi que les expériences de METALNICOV, de ISCHIMORI, de TATEIWA, et de nous-mêmes, sur l'immunisation des chenilles de *Galleria mellonella* contre le *Bacterium galleriæ* n° 2, n'ont donné que des résultats négatifs.

D'après ces travaux, on sait que ce microbe est exceptionnellement virulent pour ces chenilles.

Si l'on infecte des chenilles avec le *Bacterium galleriæ* n° 2, la phagocytose n'a pas du tout lieu ; de même, on n'a pas observé de bactériolyse.

Les microbes injectés se multiplient sans obstacle dans le corps des chenilles et déterminent une infection générale qui entraîne la mort.

D'autre part, ce microbe produit des spores. Il est très difficile de préparer un vaccin efficace, car la température de 60° ne tue pas les spores et l'émulsion de cette bactérie chauffée plusieurs minutes à 100° n'immunise pas les chenilles.

Dernièrement, nous avons repris cette question, et nous avons tenté d'obtenir une race asporogène et affaiblie de ce microbe en utilisant le procédé bien connu du docteur Roux, à l'acide phénique.

Après quelques échecs, nous avons pu obtenir une culture asporogène de *Bacterium galleriæ* n° 2. Pour affaiblir encore plus ce microbe, nous l'avons fait développer à une température de 40 à 41°.

Après 15 repiquages de la culture asporogène à cette température, le microbe est devenu environ 45 à 50 fois moins virulent que la culture primitive. La morphologie du microbe n'a pas changé d'une manière appréciable (excepté l'absence des spores), mais il donne très facilement les formes d'involution les plus variées, et alors sa vitalité est devenue très fragile.

La culture sur gélose inclinée périt en 12 à 20 jours à la température du laboratoire. C'est le milieu de TRUCHE qui nous a permis de conserver cette souche le plus longtemps sans repiquage.

Il est très intéressant de constater que ce microbe est alors devenu phagocytable : 3 ou 4 heures après l'injection d'une faible dose de cette culture dans la cavité générale du corps des chenilles, on ne voit que très peu de microbes libres sur des frottis colorés du sang ; la plupart sont déjà phagocytés et sont en voie de destruction.

Une émulsion de ce microbe asporogène chauffée à 60° une demi-heure et injectée dans la cavité générale des chenilles les immunise très bien contre la race affaiblie.

Nous allons citer deux de nos expériences.

Expérience n° 3 du 16 décembre 1927. — 10 chenilles de *Galleria* ont été injectées par 1/100 de centimètres cubes du vaccin (culture de 3 jours de *B. galleriæ* n° 2 asporogène sur la gélose inclinée, émulsionnée dans

10 centimètres cubes d'eau physiologique chauffée une heure à la température de 58°).

24 heures après, les chenilles immunisées ainsi que les chenilles témoins, ont reçu une dose mortelle de souche asporogène de *Bacterium galleriæ* n° 2, et nous avons obtenu les résultats suivants.

	Après 24 heures	Après 7 jours
Chenilles vaccinées. . . .	0 morte ; 10 vivantes	1 morte ; 9 vivantes
Chenilles témoins	9 mortes ; 1 vivante	1 morte ; 0 vivante

Expérience n° 6 du 3 janvier 1928. — 10 chenilles de *Galleria* ont été immunisées avec 1/100 de centimètre cube de vaccin (culture de 48 heures sur la gélose inclinée de *B. galleriæ* n° 2 asporogène émulsionnée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique et chauffée une demi-heure à la température de 60°).

24 heures après les chenilles immunisées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu une dose mortelle de souche asporogène de *B. galleriæ* n° 2, et nous avons obtenu les résultats suivants.

	Après 24 heures	Après 7 jours
Chenilles immunisées	0 morte ; 10 vivantes	2 mortes ; 8 vivantes
Chenilles témoins	8 mortes ; 2 vivantes	2 mortes ; 0 vivante

De plus, nous avons pu immuniser avec ce vaccin les chenilles de *Galleria* contre la culture primitive très virulente, mais dans ce cas l'immunité est beaucoup moins forte. Une partie seulement des chenilles immunisées survit à l'injection d'une dose minima mortelle de la bactérie virulente. Dans nos expériences la mortalité des chenilles immunisées varie entre 10 et 50 0/0.

Dans cet ordre d'idées, nous citerons quelques-unes de nos expériences.

Expérience n° 12 du 16 janvier 1928. — 15 chenilles de *Galleria* ont été injectées par 1/100 de centimètre cube du vaccin (culture de 6 jours de *B. galleriæ* n° 2 asporogène sur gélose inclinée, émulsionnée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique chauffée une demi-heure à la température de 60°).

24 heures après, les chenilles immunisées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu une dose minima mortelle de souche virulente de *B. galleriæ* n° 2, et nous avons obtenu les résultats suivants.

	Après 24 heures	Après 6 jours
Chenilles vaccinées. . . .	3 mortes ; 12 vivantes	3 mortes ; 9 vivantes
Chenilles témoins	15 mortes ; 0 vivante	—

Expérience n° 13 du 18 janvier 1928. — 15 chenilles de *Galleria* ont été injectées par 1/100 de centimètre cube du vaccin (culture de 24 heures de *B. galleriæ* n° 2 asporogène sur la gélose inclinée, émulsionnée dans 10 centimètres cubes d'eau physiologique chauffée une demi-heure à la température de 60°).

24 heures après, les chenilles immunisées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu une dose minima mortelle de souche virulente de *B. galleriæ* n° 2, et nous avons obtenu les résultats suivants.

	Après 24 heures	Après 9 jours
Chenilles vaccinées. . . .	4 mortes ; 11 vivantes	3 mortes ; 8 vivantes
Chenilles témoins	15 mortes ; 0 vivante	—

Il est donc possible d'obtenir du *Bacterium galleriæ* n° 2, une race asporogène très affaiblie. L'injection des microbes tués de la culture affaiblie immunisent les chenilles de *Galleria mellonella* contre cette race, ainsi que contre la souche la plus virulente de cette bactérie.

L'immunisation des chenilles de *Galleria* contre ce microbe présente une certaine analogie avec la vaccination des mammifères contre le charbon. Il est à remarquer la parenté assez proche de la Bactérie charbonneuse et le *Bacterium galleriæ* n° 2.

3° *Concentration et dose du vaccin.* — En ce qui concerne l'immunisation par les microbes tués ou affaiblis, il y a une chose assez importante à mentionner : quelle dose des divers vaccins importe-t-il de mettre en œuvre pour assurer l'immunité ?

Comme nous l'avons indiqué dans le chapitre précédent, les insectes sont très sensibles envers les endotoxines que la plupart des microbes contiennent, et si l'on injecte le vaccin à des doses très fortes, on intoxique l'insecte au lieu de l'immuniser.

D'autre part, l'injection de vaccin à très faibles doses peut n'être pas suffisante pour assurer une immunité.

Nous avons entrepris des recherches spéciales pour résoudre cette question, et je vais citer quelques-unes de mes expériences, faites avec le *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle.

Nous avons fait les dilutions de vaccin de la manière que nous avons indiquée dans le premier chapitre.

Comme vaccin, nous avons utilisé les différentes émulsions des Coccobacilles poussés sur la gélose inclinée et chauffée à la température de 60° pendant une demi-heure.

Expérience du 22 août 1927, faite à la température de 25°. — Nous avons préparé quatre émulsions de diverses concentrations.

Dans quatre tubes contenant chacun 1 centimètre cube d'eau physiologique, nous avons mis les différentes quantités de l'émulsion initiale.

Dans le premier tube, nous avons mis 1/2 goutte, dans le deuxième, 1 goutte, dans le troisième, 3 gouttes, et dans le quatrième, 6 gouttes. Nous avons injecté 6 chenilles avec 1/100 de centimètre cube de chacun de ces vaccins.

Le lendemain, les chenilles de trois premiers lots étaient bien portantes, tandis que les chenilles qui avaient reçu le vaccin le plus concentré étaient malades.

Toutes ces chenilles, ainsi que les 6 chenilles témoins avaient reçu les microbes vivants à une dose environ 20 fois plus forte que la dose minima mortelle.

	Après 24 heures	Après 6 jours
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 1/2 goutte pour 1 cm ³	2 mortes ; 4 vivantes	1 morte ; 3 vivantes
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 1 goutte pour 1 cm ³	0 morte ; 6 vivantes	0 morte ; 6 vivantes
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 3 gouttes pour 1 cm ³	3 mortes ; 3 vivantes	0 morte ; 3 vivantes
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 6 gouttes pour 1 cm ³	6 mortes ; 0 vivante	—
Chenilles témoins	6 mortes ; 0 vivante	—

Expérience du 28 août 1927, faite à la température de 30°. — Comme dans l'expérience précédente, nous avons utilisé les microbes chauffés à la température de 60° pendant une demi-heure.

Nous avons préparé trois dilutions différentes de vaccin : 1/2 goutte, 1 goutte et 3 gouttes de l'émulsion initiale pour 1 centimètre cube de l'eau physiologique.

12 Chenilles ont été inoculées avec 1/100 de centimètre cube de chacune de ces émulsions.

Le lendemain, toutes ces chenilles et 12 chenilles témoins ont reçu les microbes vivants à une dose 25 fois plus forte que la dose minima mortelle.

	Après 24 heures	Après 5 jours
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 1/2 goutte pour 1 cm ³	1 morte ; 11 vivantes	3 mortes ; 8 vivantes
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin 1 goutte pour 1 cm ³	0 morte ; 12 vivantes	2 mortes ; 10 vivantes
Chenilles ayant reçu dilution de vaccin. 3 gouttes pour 1 cm ³	6 mortes ; 6 vivantes	2 mortes ; 4 vivantes
Chenilles témoins . . .	12 mortes ; 0 vivante	—

De ces expériences, il ressort qu'il existe une concentration optima de vaccin, et cette concentration assure mieux l'immunité que les concentrations plus faibles ou plus fortes.

Il arrive souvent que les injections du vaccin répétées dans un espace de temps assez court, donnent une immunité moins forte qu'une seule injection, car les chenilles sont intoxiquées par les quantités considérables de microbes inoculés.

4° *Immunisation des insectes par la voie buccale.* — Certains auteurs ont tenté d'immuniser les insectes par la voie buccale, mais toutes les tentatives faites jusqu'à présent n'ont donné que des résultats contradictoires.

C'est ainsi que GLASER, qui a travaillé avec le microbe qui cause une maladie du genre flacherie chez les vers à soie, n'a pas pu immuniser cet insecte en lui faisant ingérer les cultures tuées de ce microbe.

Après un ou plusieurs jours, l'auteur inoculait aux vers immunisés des microbes vivants, mais les vers soi-disant immunisés périssaient en même temps que les vers normaux qui n'étaient pas nourris avec les microbes.

De même, AGHAR n'a pas pu immuniser *per os* les chenilles processionnaires du pin (*Cnethocampa pitiocampa* Schiff) vis-à-vis de *Bacillus pierris liquefaciens* Paillot.

Nous-même, nous avons essayé d'immuniser les chenilles de la Pyrale du Mais (*Pyrausta nubilalis* Hbn) contre la race asporogène de *B. galleriæ* n° 2, Mét. et Chor.

Il est à rappeler que cet insecte s'infecte assez facilement par la voie buccale avec un grand nombre de microbes.

Expérience du 16 février 1929, faite à la température de 30°. — 20 Chenilles de *Pyrausta* ont été mises dans un bocal avec des petits morceaux de tige d'armoise commune (*Artemisia vulgaris* L.) imprégnés avec une émulsion épaisse de *B. galleriæ* n° 2 asporogène, chauffée pendant une heure à la température de 60°.

Le lendemain, 10 des chenilles immunisées, ainsi que 10 chenilles témoins ont été inoculées dans le sang avec une dose mortelle de microbes vivants de la même souche.

48 heures après, toutes les chenilles étaient mortes.

Le 19 février, 10 autres chenilles immunisées le 16 février, ont reçu la dose mortelle de *B. galleriæ* n° 2 asporogène.

Nous avons inoculé avec la même dose du microbe 10 chenilles témoins.

Toutes les chenilles périrent en peu de jours.

Expérience faite le 12 mars 1929, à la température de 30°. — 15 Chenilles de *Pyrausta* ont été mises dans un bocal avec des petits morceaux de tige d'armoise commune (*Artemisia vulgaris* L.) imprégnés avec une émulsion épaisse de *B. galleriæ* n° 2 asporogène, chauffée pendant une heure à la température de 60°.

5 jours plus tard, toutes les chenilles étaient bien portantes, et elles ont toutes été inoculées ainsi que 15 chenilles normales avec une dose minima mortelle de *B. galleriæ* n° 2 asporogène.

Toutes les chenilles vaccinées ainsi que les chenilles témoins sont mortes en 3 jours.

De ces observations, il ressort que la vaccination des chenilles par la voie buccale avec des microbes tués par la chaleur, n'entraîne pas l'immunité générale pour les chenilles en expérience.

Cependant VELU et BOIN ont fait des expériences très intéressantes avec le coccobacille d'HÉRELLE.

D'après ces auteurs, les criquets nourris avec les cultures peu virulentes de ce microbe acquièrent une immunité générale.

Malheureusement, ces expériences n'ont été faites que sur 6 criquets, et, vu les succès des autres savants qui ont fait des expériences analogues sur d'autres insectes, nous devons nous abstenir de tirer une conclusion quelconque. De nouvelles expériences sont nécessaires pour résoudre ce problème.

Des insectes qui ont ingéré les vaccins deviennent-ils plus résistants à l'infection par la voie buccale avec des microbes

pathogènes, c'est-à-dire : les cellules de l'intestin peuvent-elles seules acquérir une immunité ?

En 1911, d'HÉRELLE a isolé au Mexique des criquets pendant une épizootie, un microbe extrêmement virulent pour cet insecte qu'il a désigné sous le nom de *Coccobacillus acridiorum*.

Le coccobacille cultivé sur un milieu artificiel perd très rapidement sa virulence et après quelques passages sur la gélose, il ne peut plus donner une infection mortelle par la voie buccale, mais provoquer seulement une maladie passagère.

L'auteur a tenté d'infecter les criquets rétablis après la maladie provoquée par l'ingestion des cultures affaiblies, avec des cultures très virulentes, mais tous ces criquets se sont montrés complètement réfractaires, et ne contractaient plus la maladie.

Il faut en conclure que l'immunité est acquise par une attaque bénigne, étant donné que tous les criquets normaux qui ont absorbé une goutte de culture virulente sont morts.

Les observations de d'HÉRELLE sont confirmées par SERGENT, qui a essayé sans succès de produire une épizootie avec le microbe de d'HÉRELLE dans les conditions naturelles.

Cet insuccès s'explique par l'existence de deux espèces de Coccobacilles voisins de celui de d'HÉRELLE. Des insectes ayant été infectés par ces germes et ayant ainsi contracté une affection bénigne survécurent et devinrent par la suite réfractaires contre le *Coccobacillus acridiorum*.

VELU et BOIN ont fait des observations analogues.

Nous avons cru intéressant d'étudier cette question de plus près, et dans cet ordre d'idées, nous avons entrepris une série d'expériences.

Nous avons travaillé avec le *Coccobacillus ellingeri* Mét. et Chor. sur les chenilles de la Pyrale du Maïs.

D'abord, nous avons mis les chenilles dans de petits bocaux avec des morceaux de tige d'*Artemisia* mouillées avec l'émulsion des coccobacilles tués par la chaleur, et après un ou plusieurs jours nous avons transporté les chenilles dans les bocaux contenant l'armoise mouillée avec l'émulsion des microbes vivants.

Nous allons citer deux de nos expériences faites avec ce microbe.

Expérience faite le 13 février 1929. — 20 chenilles de *Pyrausta* ont été mises dans un bocal contenant des petits morceaux de tige d'armoise commune imprégnées avec une émulsion épaisse de *Coccobacillus ellingeri*, chauffée pendant une heure à la température de 58°.

3 jours plus tard, les 20 chenilles ont été mises dans le bocal contenant les morceaux d'armoise mouillés avec une émulsion épaisse des coccobacilles vivants. 20 chenilles témoins ont été mises dans les mêmes conditions.

3 jours après, parmi les chenilles vaccinées, nous avons trouvé 9 chenilles mortes et 11 vivantes. Parmi les chenilles témoins, 15 chenilles mortes et 5 vivantes.

Une autre expérience faite le 26 février nous a donné à peu près les mêmes résultats.

Pour cette expérience, nous avons mis 15 chenilles de *Pyrausta* avec des morceaux de tige d'*Artemisia* mouillés avec une émulsion de coccobacilles chauffée pendant 30 minutes à la température de 60°.

2 jours plus tard, nous avons trouvé 2 chenilles mortes; les autres, bien portantes, ont été mises dans un bocal avec des morceaux de tige d'armoise imprégnés avec l'émulsion des microbes vivants. 13 chenilles témoins ont été mises dans des conditions identiques.

3 jours après, 6 chenilles immunisées sont mortes et parmi les chenilles normales, 8 sont mortes et 5 sont restées vivantes.

Nous avons fait quatre expériences sur 67 chenilles.

Les chiffres obtenus pour ces expériences sont les suivants.

Parmi les chenilles vaccinées : 34 sont mortes et 33 ont survécu à l'infection *per os*, c'est-à-dire que la mortalité a été d'environ 51 0/0. Pour les chenilles témoins, nous avons trouvé une mortalité de 75 0/0, car nous avons eu 50 chenilles mortes et 17 chenilles vivantes.

Ces expériences nous montrent que les chenilles de la Pyrale du Maïs deviennent plus résistantes vis-à-vis de l'infection par la voie buccale, après avoir mangé les microbes tués par la chaleur, et du moment où cette immunité ne se généralise pas, c'est donc que les cellules de l'intestin seules acquièrent une certaine résistance, d'ailleurs assez faible.

5° *Espèces des Insectes chez lesquelles on a étudié l'immunité acquise.* — MÉTALNICOV et ses élèves : CHIGASSAKI, ISCHIMORI, GASCHEN, TATEIWA, ZERNOFF et moi-même, avons beaucoup étudié l'immunité acquise contre les divers microbes chez les chenilles, et beaucoup moins chez les chrysalides et les papillons de *Galleria mellonella* L.

GLASER a immunisé les vers à soie (*Bombyx mori*) contre un microbe provoquant la flacherie chez cet insecte.

MÉTALNICOV et moi, nous avons étudié l'immunité acquise

chez les chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hbn contre le microbe de Danysz.

PAILLLOT a immunisé les chenilles d'*Agrotis segetum* Schiff contre les doses mortelles de *Bacillus melolonthæ non liquefaciens*, α et a étudié les diverses réactions d'immunité chez plusieurs espèces de chenilles.

HOLLANDE et VICHER ont immunisé les chenilles de *Pieris brassicæ* L. contre le *Bacillus pieris liquefaciens* α Paillot.

AGHAR a travaillé sur les chenilles de *Lithosia complana* L., d'*Aporia cratægi* L., de *Pieris brassicæ* L., et sur les chenilles d'une noctuelle de l'aubépine (espèce non déterminée). Il a réussi à immuniser ces chenilles contre le *Bacillus pieris liquefaciens* α . VICHER a immunisé les chenilles d'*Aporia cratægi* L. contre le même microbe.

Parmi les autres groupes d'insectes, on a étudié l'immunité chez les Hyménoptères : c'est ainsi que TOUMANOFF a pu immuniser les abeilles adultes (*Apis mellifera* L.) contre l'injection de doses mortelles de *Bacillus alvei* Ch. et Ch.

MÉTALNICOV et TOUMANOFF ont étudié les réactions cellulaires et la phagocytose chez les larves des abeilles, ainsi que l'immunité contre les *Bacillus alvei*, les staphylocoques et les *Bacillus larvæ* White.

Après cette énumération, nous voyons que seulement un nombre très restreint d'espèces a été immunisé jusqu'à présent.

Précédemment, nous avons indiqué, pour les différents insectes (excepté pour les chenilles de *Galleria mellonella*), les microbes contre lesquels ils ont été immunisés.

L'immunité chez les chenilles de *Galleria* a été étudiée contre de nombreuses espèces microbiennes : contre certaines races de staphylocoque, contre le vibrion cholérique, contre le bacille de la peste, contre le bacille dysentérique Shiga, contre les bacilles typhique et paratyphiques A et B, contre le *Bacterium subtilis*, contre le *Proteus* n° 19, contre le microbe de Danysz, contre le *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle, le *Bacterium thiotrix*, contre le *Bacterium subtilis* var. *galleriæ* et le *Bacterium galleriæ* n° 2, mais il y a toute une série de microbes contre lesquels cet insecte ne s'immunise pas.

Nous avons parlé déjà de *B. galleriæ* n° 2 contre lequel on

ne peut immuniser les chenilles qu'avec le vaccin préparé de la culture asporogène. Toutes les tentatives faites par MÉTALNICOV, ISCHIMORI, TATEIWA, et par nous-même, de 1922 à 1927, pour immuniser les chenilles de *Galleria* contre le charbon, le staphylocoque, le gonocoque et le *Bacterium galleriæ* n° 1, n'ont donné que des résultats négatifs.

Cependant le *Bacterium galleriæ* n° 1, isolé en 1922, et depuis cultivé sur milieu artificiel, a beaucoup changé, et l'année dernière nous avons pu immuniser le *Galleria* contre ce microbe.

Ce fait nous montre encore une fois quelle importance a le facteur microbe.

Il est intéressant de remarquer que la virulence de ce microbe n'a pas changé d'une façon appréciable : la dose minima mortelle reste toujours à peu près identique.

Nous allons étudier en détail dans un des chapitres suivants ce fait particulièrement intéressant.

Nous avons indiqué déjà que la virulence d'un microbe pour les insectes varie largement, et il est certain que les différentes souches de microbes cités ci-dessous ne donneront pas les mêmes résultats.

Tout dernièrement, ZERNOFF n'a pas pu immuniser les chenilles de *Galleria* contre une souche de *Coccobacillus acridiorum*, souche qu'il a reçue de la collection de l'Institut Pasteur.

6° *Temps nécessaire pour obtenir l'immunité acquise.* — Il est reconnu que l'immunité acquise exige quelque temps pour se constituer.

Ce temps varie ordinairement de 5 à 15 jours, chez les animaux supérieurs comme chez les hommes. Les génisses sont déjà immunisées au bout de 5 jours, après l'inoculation de vaccin jennérien à la peau.

L'immunité antityphique exige pour s'établir un laps de temps à peu près égal. L'immunité antirabique s'établit plus lentement.

En ce qui concerne les insectes, ce sont MÉTALNICOV et GASCHEN qui ont étudié cette question.

Ces auteurs ont démontré que les chenilles de *Galleria* s'immunisent avec une rapidité surprenante contre le vibron du choléra Sal, qui n'est pas très pathogène pour cet insecte.

Au bout de 2 heures $1/2$ ou 3 heures, après l'injection du vaccin (microbes chauffés à 58°), les chenilles sont bien immunisées contre des doses mortelles du virus.

Contre les microbes très virulents, l'immunité exige pour s'établir un laps de temps plus long. Après l'injection du vibriion cholérique Pot, chauffé à 58° , les chenilles ne sont immunisées qu'au bout de 7 heures; ce dernier vibriion est extrêmement virulent pour les *Galleria*.

Cet insecte s'immunise plus rapidement contre les microbes peu pathogènes et ordinairement l'immunité contre ces microbes est beaucoup plus forte et durable que celle contre les microbes très virulents.

7^e *Durée de l'immunité acquise.* — Il est connu que l'immunité acquise est plus ou moins persistante.

Chez les animaux supérieurs, nous connaissons des cas où l'immunité acquise persiste pendant des années : chez les hommes, contre la variole, la scarlatine, la diphtérie ; chez les animaux contre le charbon, la rage, etc.

Chez les insectes, on a étudié l'immunité acquise surtout les premiers jours après la vaccination.

Est-ce que cette immunité qui commence à se manifester au bout de quelques heures dure longtemps ?

Malheureusement la vie des insectes qui ont servi pour les expérimentations est assez courte, et les expériences en vue d'établir la durée de l'immunité sont donc limitées par le temps.

CHIGASSAKI, qui, comme nous l'avons dit, étudia l'immunité naturelle et acquise aux stades différents du développement de *Galleria*, s'est occupé aussi de l'étude de la durée de l'immunité acquise chez cet insecte.

Il a démontré que les chenilles immunisées contre le microbe de Danysz transmettent la résistance acquise aux chrysalides et aux papillons.

Il est donc certain que, contre le microbe de Danysz, *Galleria* reste immunisée pendant 3 à 4 semaines.

Dernièrement, nous avons étudié l'immunité acquise des chenilles de la mite des abeilles contre le *Coccobacillus acridorum* d'Hérelle. Ce coccobacille est extrêmement pathogène pour les chenilles, mais cet insecte s'immunise très facilement

contre l'injection de ce microbe à des doses de 20 à 25 fois plus fortes que la dose minima mortelle.

Nous avons cité plus haut quelques expériences faites avec ce microbe, quand nous avons parlé des doses optima du vaccin. Les inoculations du virus ont été faites 24 heures après la vaccination.

Cependant, les injections des virus, même à une dose beaucoup plus faible (5 à 10 fois plus forte que la dose minima mortelle) montrent que, 48 heures après la vaccination, les chenilles ne sont plus aussi résistantes qu'elles ne l'étaient un jour avant. 3 ou 4 jours après la vaccination, les chenilles ne supportent plus l'injection d'une dose minima mortelle, c'est-à-dire que l'immunité acquise est déjà complètement disparue.

Expérience n° 10 faite le 2 novembre 1926. — 16 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube du vaccin de *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle (culture de 3 jours sur la gélose inclinée, émulsionnée dans un centimètre cube d'eau physiologique et chauffée à 60° pendant une demi-heure. Une goutte de cette émulsion épaisse a été mise dans 1 centimètre cube de l'eau physiologique, et c'est l'émulsion faible que nous avons utilisée).

Le lendemain, deux de ces chenilles sont mortes d'une infection microbienne étrangère.

24 heures après la vaccination, 5 chenilles immunisées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu les microbes vivant à une dose 10 fois plus forte que la dose minima mortelle.

	Après 24 heures	Après 6 jours
Chenilles immunisées . . .	5 vivantes ; 0 morte	5 vivantes ; 0 morte
Chenilles témoins . . .	1 vivante ; 4 mortes	0 vivante ; 4 morte

5 autres chenilles, immunisées le 2 novembre, ont été inoculées avec la même dose de virus que les chenilles précédentes le 4 novembre.

	Après 24 heures	Après 6 jours
Chenilles immunisées . . .	1 vivante ; 4 mortes	1 vivante ; 0 morte
Chenilles témoins . . .	0 vivante ; 5 mortes	—

Le 5 novembre, les quatre dernières chenilles immunisées le 2 novembre, ont reçu le virus à une dose 10 fois plus forte que la dose minima mortelle, et nous avons obtenu les résultats suivants.

	Après 24 heures
Chenilles immunisées	0 vivante ; 4 mortes
Chenilles témoins	0 vivante ; 4 mortes

Expérience n° 14 du 6 novembre 1926. — 10 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube du vaccin de *Coccobacillus acridiorum* (culture de 5 jours en bouillon, chauffée une demi-heure à 60°).

4 jours après, cinq de ces chenilles ont reçu la dose minima mortelle de virus.

	Après 24 heures	Après 6 jours
Chenilles immunisées	3 vivantes ; 2 mortes	1 vivante ; 2 mortes
Chenilles témoins	2 vivantes ; 3 mortes	0 vivante ; 3 mortes

De ces expériences, il ressort que les chenilles de *Galleria* ne s'immunisent contre le *Coccobacillus acridiorum* que pour 24 à 36 heures.

Les essais faits par MÉTALNICOV, par ISCHIMORI, par GASCHEN, par CHIGASSAKI, et par moi-même, ont démontré que, contre les autres microbes, comme le staphylocoque, le choléra, etc., l'immunité acquise persiste plusieurs jours, et que les chenilles de *Galleria* restent immunisées au moins pendant 10 à 20 jours.

De toutes ces observations, ainsi que de ces expériences, nous pouvons conclure que l'immunité acquise contre certains microbes est très courte ; contre les autres, elle est beaucoup plus persistante et peut se transmettre des chenilles aux chrysalides et aux papillons.

Sans aucun doute, l'immunité acquise se manifeste avec plus de force pendant les premiers jours, elle atteint le maximum, 24 heures après la vaccination, et cela est vrai pour tous les microbes dont nous nous sommes servi au cours de nos recherches. Elle disparaît brusquement contre les uns, tandis que contre les autres, elle décroît lentement.

8° *Hérédité de l'immunité acquise.* — D'après les travaux d'EHRlich, REMLINGER, VAILLARD, DIEUDONNÉ, KREIDL, MAUD, ABEL,

FISCHL et WIMSKHEIM, VIDAL et SICARD, KRAUS et plusieurs autres, on admet que chez les animaux supérieurs, l'immunité transmise par la mère à la progéniture s'explique par le passage des anticorps à travers le placenta pendant la grossesse. Quant au père, son rôle est nul : même solidement vacciné, il ne lègue à la progéniture aucune immunité.

En ce qui concerne les insectes, cette question très intéressante a été abordée par M. MÉTALNICOV, qui a fait des expériences sur les chenilles de *Galleria*, qui donnent de 6 à 8 générations par an à la température de 30°.

Ce savant immunisa 15 générations successives contre le microbe de DANYSZ, chacune avec 2 ou 3 injections du vaccin. L'immunité acquise a été contrôlée pour chacune des générations. Pour cela, il a pris des chenilles qui n'étaient pas vaccinées préalablement, et il a constaté que les deux premières générations n'étaient pas immunisées contre l'injection de la dose minima mortelle du microbe de DANYSZ. Parmi les chenilles de la troisième génération, il en a trouvé 30 0/0 d'immunisées, et pour les autres générations, ce pourcentage a augmenté jusqu'à 77 0/0 (d'ailleurs il varie irrégulièrement d'une génération à l'autre).

MÉTALNICOV prenait toujours les chenilles dont la génération précédente avait été immunisée. On peut se demander si les principes immunisants en quantité très faible ne sont pas passés aux œufs au cours de leur développement dans le corps de la mère ⁽¹⁾.

9° *Spécificité de l'immunité acquise.* — Tous les bactériologistes admettent que l'immunité acquise chez les animaux supérieurs est spécifique.

« Le caractère le plus frappant de l'immunité acquise, c'est la spécificité. La guérison de la fièvre typhoïde, de la rougeole, de la coqueluche, etc., met l'organisme à l'abri de la même maladie, sans protéger aucunement contre des infections différentes. En d'autres termes, la réaction défensive vise, avec une précision surprenante, la cause même qui l'a suscitée », écrit

(1) Pour que ces expériences soient tout à fait démonstratives, il est nécessaire de voir si cette immunité acquise se conserve pendant plusieurs générations successives, non immunisées au préalable.

J. BORDET, dans son remarquable *Traité de l'immunité dans les maladies infectieuses*.

L'immunité acquise chez les Invertébrés, et chez les Insectes, en particulier, est-elle spécifique ?

Les opinions des savants sur cette question ne sont pas tout à faits concordantes. Ainsi PAILLLOT est arrivé à conclure, que chez les insectes l'immunité est spécifique comme chez les vertébrés.

Dans les travaux de S. MÉTALNICOV sur l'immunité chez les chenilles de *Galleria*, on trouve des indications en faveur de cette conception, mais plus récemment, ce savant, en collaboration avec ISCHIMORI, a pu immuniser des chenilles contre le vibrion du choléra M, peu virulent pour cet insecte, non seulement au moyen de vaccin spécifique, mais aussi au moyen de filtrats des cultures, d'encre de chine et des vaccins non spécifiques préparés en partant de différents microbes : *b. coli*, *b. charbonneux*, *b. dysentérique* et un microcoque isolé des chenilles de *Galleria*.

Nous avons fait de nombreuses expériences sur la spécificité de l'immunité acquise chez les chenilles de *Galleria mellonella* L.

Nous les avons immunisées contre certains microbes choisis parmi ceux qui donnent les meilleurs résultats. Ce sont le *B. subtilis* var. *galleriæ*, le *B. thirotrix*, le *Coccobacillus acridiorum* d'Hérelle, le vibrion cholérique et le microbe de DANYSZ.

Comme vaccin, nous avons employé, outre les microbes énumérés ci-dessus, les émulsions de *B. galleriæ* n° 1, de *B. galleriæ* n° 2, du staphylocoque doré, des bacilles tuberculeux humains et le bouillon.

Nous avons préparé nos vaccins de la manière suivante : une culture sur la gélose inclinée, âgée de un ou quelques jours, a été émulsionnée dans 1 centimètre cube d'eau physiologique. Cette émulsion a été chauffée une demi-heure à 60°, et diluée de la manière dont nous avons parlé plus haut.

Expérience faite le 27 novembre 1926. — 40 Chenilles ont été immunisées de la manière suivante :

1° 10 Chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de *B. thirotrix*.

2° 10 Chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de staphylocoque doré.

3° 10 Chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de vibrion cholérique.

4° 10 Chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion de bacilles tuberculeux.

Le lendemain, toutes ces chenilles étaient bien portantes, et elles ont toutes reçu, ainsi que les chenilles témoins, une dose mortelle de microbes vivants de *Bact. subtilis* var. *galleriæ*.

5 jours après, nous avons obtenu les résultats suivants :

1° Parmi les chenilles vaccinées par le *B. thirotrix* : 9 étaient vivantes, une était morte.

2° Les 10 chenilles vaccinées par le staphylocoque étaient vivantes.

3° Parmi les chenilles vaccinées par le vibrion du choléra : 8 étaient vivantes, 2 étaient mortes.

4° Parmi les chenilles vaccinées par le bacille tuberculeux : 9 étaient vivantes et une était morte.

5° Toutes les chenilles témoins étaient mortes.

Expérience faite le 30 novembre 1926. — 24 Chenilles de *Galleria* ont été immunisées de la manière suivante :

1° 12 Chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de coccobacilles de d'HÉRELLE.

2° 12 autres chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de vibrion de choléra.

3 jours après, une des chenilles immunisées contre le coccobacille est morte d'une infection bactérienne étrangère.

10 Chenilles de chaque lot, ainsi que 10 chenilles témoins ont reçu une dose mortelle de microbes de DANYSZ.

Au bout de 5 jours, nous avons obtenu les résultats suivants.

Les chenilles immunisées contre le coccobacille sont toutes restées vivantes, ainsi que les chenilles immunisées contre le choléra. Les chenilles témoins sont toutes mortes.

Expérience faite le 16 décembre 1926. — Nous avons immunisé 40 chenilles de *Galleria* de la façon suivante :

1° 10 Chenilles ont reçu 1/100 de centimètre cube de bouillon stérile.

2° 10 Chenilles ont reçu 1/100 de centimètre cube de l'émulsion chauffée à 100° pendant quelques minutes de *B. galleriæ* n° 2.

3° 10 Chenilles ont reçu 1/100 de centimètre cube de l'émulsion chauffée à 60° pendant une demi-heure de vibrion du choléra.

4° 10 Chenilles ont reçu 1/100 de centimètre cube de l'émulsion chauffée de *Coccobacillus acridiorum*.

24 heures après toutes les chenilles étaient vivantes, et elles ont reçu toutes, ainsi que les chenilles témoins, une dose mortelle de coccobacilles d'HÉRELLE.

3 jours après, toutes les chenilles immunisées étaient vivantes; toutes les chenilles témoins étaient mortes.

Expérience faite le 16 décembre 1926. — Nous avons immunisé 40 chenilles de *Galleria* exactement comme dans l'expérience précédente, et avec les mêmes vaccins.

4 jours après la vaccination, les chenilles immunisées, de même que les chenilles normales, ont reçu une dose minima mortelle de coccobacilles d'HÉRELLE.

Au bout de cinq jours, nous avons obtenu les résultats suivants :

1^o Toutes les chenilles qui ont reçu le bouillon sont mortes.

2^o Parmi les chenilles immunisées avec le *B. galleriæ* n^o 2, une est restée vivante, 9 sont mortes.

3^o Parmi les chenilles immunisées avec le vibrion cholérique, 2 sont restées vivantes, 8 sont mortes.

4^o Parmi les chenilles immunisées avec le coccobacille, une est restée vivante, 9 sont mortes.

5^o Parmi les chenilles témoins : une est restée vivante, 9 sont mortes.

Des deux dernières expériences, il ressort que l'immunité contre le *Coc-cobacillus acridiorum* peut être créée non seulement au moyen de vaccin spécifique, mais aussi bien par l'injection du bouillon et des émulsions chauffées des différents microbes.

Il est très curieux de constater que l'immunité contre ce microbe est toujours d'une très courte durée. Elle dure à peine deux jours.

Nous avons déjà vu que contre les autres microbes l'immunité est généralement beaucoup plus persistante. Reste-t-elle de même persistante avec le vaccin non spécifique ?

Nous allons citer deux de nos expériences.

Expérience faite le 30 décembre 1926. — 1^o 10 jeunes chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion chauffée de staphylocoque doré.

2^o 10 jeunes chenilles ont reçu 0 cm³ 01 d'une émulsion de vibrion cholérique.

12 jours après, les chenilles vaccinées et les chenilles témoins ont reçu une dose mortelle de microbes vivants de *B. subtilis* var. *galleriæ*.

Toutes les chenilles témoins étaient mortes 6 jours après.

Parmi les chenilles vaccinées par le staphylocoque, 6 étaient vivantes et 4 étaient mortes.

Parmi les chenilles vaccinées par le vibrion cholérique : 5 étaient vivantes et 5 étaient mortes.

Expérience faite le 31 janvier 1927. — 20 jeunes chenilles ont été immunisées de la façon suivante :

1^o 10 Chenilles ont reçu 1/400 de centimètre cube d'une émulsion de *B. subtilis* var. *galleriæ* chauffée à 58° pendant une demi-heure.

2^o 10 Chenilles ont reçu 1/400 de centimètre cube d'une émulsion de *Coc-cobacillus acridiorum* chauffée à 58° pendant une demi-heure également.

21 jours après, parmi les chenilles immunisées, un certain nombre se sont transformées en nymphes. C'est pour cette raison que nous avons pris 6 chenilles de chaque lot et 6 chenilles normales, et que nous les avons infectées avec une dose minima mortelle de vibrion cholérique.

3 jours après, nous avons obtenu les résultats suivants.

1^o Parmi les chenilles vaccinées avec le coccobacille : 4 sont restées vivantes et 2 sont mortes.

2^o Parmi les chenilles immunisées avec le *B. subtilis* : 6 sont restées vivantes.

Toutes les chenilles témoins sont mortes.

Il est intéressant de constater que l'injection d'une émulsion chauffée de staphylocoque doré ou de *B. galleriæ* n° 1 et de *B. galleriæ* n° 2, immunise les chenilles contre les divers microbes, tandis qu'il est impossible de les immuniser contre les microbes qui nous ont servi pour préparer le vaccin.

Nous avons constaté au cours de nos expériences que l'injection du bacille tuberculeux contre lequel les chenilles de *Galleria* sont complètement réfractaires, confère une immunité moins forte que l'injection des microbes non acido-résistants.

De toutes ces observations, nous pouvons tirer les conclusions suivantes : l'injection dans la cavité générale d'une substance albuminoïde étrangère augmente toujours la résistance naturelle de la chenille qui peut alors supporter l'injection de la dose mortelle des divers microbes. Cet effet de vaccination dure plus ou moins longtemps (le temps est différent suivant les virus). D'une façon générale, il est très fort 24 heures après la vaccination et s'affaiblit peu à peu.

Nous pouvons alors considérer que l'immunité acquise chez les chenilles de *Galleria mellonella* est loin d'être spécifique, au moins pendant les vingt premiers jours.

On sait que chez les animaux supérieurs, on peut, par injection préalable de substance protéique, les préserver contre l'inoculation de la dose mortelle de certains microbes.

SAMOÏLOFF, en inoculant dans le péritoine des cobayes les bouillons au blanc d'œuf, a constaté que 24 heures après ces cobayes pouvaient supporter la dose mortelle du choléra.

Depuis, on a beaucoup étudié la protéinothérapie.

Un caractère très important de la vaccination non spécifique chez les animaux supérieurs, c'est qu'elle leur confère une immunité de très courte durée, au plus de quelques jours.

Nous avons vu que chez les chenilles de *Galleria* l'immunité dure pendant 20 jours, et reste non spécifique.

Ce fait nous prouve qu'il ne s'agit pas ici de protéinothérapie, et que chez les insectes on ne pourrait pas expliquer tous les phénomènes de l'immunité que nous avons vus, et surtout que nous allons voir dans les chapitres suivants par la protéinothérapie.

Nous avons vu que les chenilles de *Galleria* ne peuvent être immunisées contre le *B. galleriæ* n° 2 qu'avec les races asporogènes de ce microbe, mais cette injection les immunise

très bien en même temps contre plusieurs autres microbes.

Comme nous l'avons déjà dit, l'injection dans la cavité générale d'une substance albuminoïde étrangère augmente la résistance des chenilles. Il est à supposer que les différents protéines n'ont pas tous le même degré d'efficacité pour augmenter cette résistance (des chenilles) et que l'injection de *B. galleriæ* n° 2 asporogène confère une immunité très forte, tandis que les autres vaccins (même le *B. galleriæ* n° 2 chauffé à 100° pendant quelques minutes) donnent une immunité plus faible.

Cette immunité cependant suffit pour préserver les chenilles contre l'injection de différents microbes, mais est insuffisante pour sauver les chenilles du *B. galleriæ* n° 2, qui, comme nous l'avons déjà dit, est le microbe le plus pathogène pour cet insecte.

10° *Influence du système nerveux sur l'immunité acquise.* — Comme nous l'avons déjà vu, l'immunité acquise a été beaucoup étudiée, surtout chez les chenilles de la mite des abeilles.

MÉTALNICOV a fait des expériences extrêmement intéressantes pour étudier l'influence du système nerveux sur l'immunité acquise chez cet insecte. Il a immunisé les chenilles de *Galleria* pour ces expériences contre le vibrion cholérique M.

On sait que chez les chenilles les centres nerveux sont logés au-dessous du tégument.

En brûlant avec un fil de platine chauffé au rouge les différents ganglions, on peut aisément détruire la partie voulue du système nerveux, et, par ce moyen très simple, MÉTALNICOV est arrivé à préciser quels sont les ganglions indispensables pour que l'immunité acquise puisse s'établir.

Les chenilles supportent très bien cette opération et continuent à vivre pendant 2 à 3 semaines, mais jamais elles ne se transforment en chrysalides.

La destruction des ganglions cérébraux, ou des premiers et seconds ganglions thoraciques n'a aucune influence sur l'immunité acquise. De même, la destruction de n'importe quels ganglions ventraux n'a pas d'action appréciable sur l'immunité acquise chez les chenilles de *Galleria*.

Tout autre sont les résultats, si l'on brûle les troisièmes ganglions thoraciques. Dans ce cas, l'immunisation est impossible. Les chenilles ainsi opérées ne deviennent pas plus résistantes

après l'injection du vaccin, et il semble donc, que ces ganglions jouent un rôle très important dans l'immunité des chenilles.

Après la destruction des troisièmes ganglions thoraciques, l'index phagocytaire est beaucoup plus faible que chez les chenilles normales ayant reçu la même quantité de virus.

Les résultats obtenus par MÉTALNICOV ont été confirmés d'une manière indirecte par les expériences que nous avons entreprises en collaboration avec M. KORVINE-KROUKOVSKY sur l'immunisation des fragments isolés du corps des chenilles de *Galleria mellonella* L.

11° *Immunisation des fragments isolés du corps des chenilles.* — C'est ainsi que nous avons pu vacciner des chenilles décapitées et des chenilles dont les deux, trois ou quatre segments antérieurs ou postérieurs avaient été coupés.

Nous avons employé la méthode suivante : d'abord une forte ligature était faite à l'endroit voulu de la chenille. Puis on coupait en avant ou en arrière de cette ligature, suivant la partie du corps que l'on désirait conserver pour l'expérimentation.

Les chenilles privées de tête quelques jours avant le début de la métamorphose vivent très longtemps, bien que ne se nourrissant pas ; elles ne se transforment jamais en nymphes. Nous avons même réussi à conserver vivante une de ces chenilles pendant 83 jours, tandis que normalement *Galleria mellonella* donne une génération par mois à la température à laquelle nous avons opéré pendant toutes ces expériences (30°).

Les chenilles privées des deux segments antérieurs restent également vivantes très longtemps, contrairement à celles qui sont privées de trois ou quatre segments antérieurs (et même davantage), ou des derniers segments postérieurs sans lesquels leur survie est beaucoup plus courte. La faiblesse des chenilles privées des segments postérieurs tient peut-être à la suppression partielle ou complète des organes excréteurs.

Immédiatement, ou quelques heures après l'opération, suivant les expériences, les chenilles ont été immunisées contre le bacille de Danysz (les microbes étaient tués par chauffage : 30 minutes à la température de 60°). Les chenilles étaient inoculées 24 heures après la vaccination avec une dose mortelle de ce microbe vivant.

A ce sujet, nous citerons une de nos expériences, qui a donné des résultats très démonstratifs.

Expérience n° 18 du 20 octobre 1929. — Immédiatement après l'opération, les chenilles ont été immunisées contre le microbe de Danysz. 24 heures après la vaccination, les chenilles immunisées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu une dose mortelle minime de ce microbe, et nous avons obtenu les résultats suivants.

		4 jours après l'injection des microbes vivants		Témoins (1)
		Mortes	Vivantes	
a) Chenilles décapitées	1° immunisées . . .	0	10	36 jours
	2° non immunisées . .	9	1	
	3° non vaccinées ni inoculées . . .	0	10	
b) Chenilles privées des 2 segments antérieurs	1° immunisées . . .	1	9	28 jours
	2° non immunisées . .	9	1	
	3° non vaccinées ni inoculées . . .	0	10	
c) Chenilles privées des 3 segments antérieurs	1° immunisées . . .	7	3	49 jours
	2° non immunisées . .	10	0	
	3° non vaccinées ni inoculées . . .	0	10	
d) Chenilles privées des 6 segments antérieurs	1° immunisées . . .	8	2	45 jours
	2° non immunisées . .	10	0	
	3° non vaccinées ni inoculées . . .	1	9	
e) Chenilles privées des 2 segments postérieurs	1° immunisées . . .	6	4	26 jours
	2° non immunisées . .	9	1	
	3° non vaccinées ni inoculées . . .			
g) Chenilles normales	1° immunisées . . .	0	10	
	2° non immunisées . .	9	1	

(1) Durée moyenne de survie des chenilles témoins opérées, non vaccinées ni inoculées.

De ces expériences, résulte que :

1° les chenilles décapitées, ou même privées de 2 segments antérieurs, s'immunisent très facilement contre le microbe de Danysz, exactement comme les chenilles normales ;

2° les chenilles privées de plus de deux segments antérieurs ou des derniers segments postérieurs s'immunisent très mal, comparativement aux chenilles normales.

B. Immunité passive chez les insectes.

Les anticorps élaborés par les animaux supérieurs lors de l'immunisation peuvent-ils conférer l'immunité passive aux Invertébrés à qui on les injecte.

Les expériences faites sur cette question sont encore trop peu nombreuses. C'est ainsi que MÉTALNICOV a pu préserver les chenilles de *Galleria* contre les injections de doses mortelles de pneumocoque en les inoculant préalablement avec le sérum de cheval vacciné contre ce microbe.

Ces expériences ne sont pas tout à fait démonstratives, car nous savons maintenant que l'immunité acquise chez les insectes n'est pas spécifique et alors l'injection du sérum de cheval neuf suffirait-elle pour immuniser les chenilles contre le pneumocoque et plusieurs autres microbes. Il est difficile de se rendre compte de l'importance des anticorps spécifiques du sérum de cheval au cours de ces expériences.

Nos expériences plus intéressantes à ce point de vue ont été faites avec la toxine diphtérique, expériences dans lesquelles nous avons immunisé les chenilles de la mite des abeilles avec de l'antitoxine diphtérique, nous en parlerons plus loin en détail. Ici les anticorps élaborés dans le sang du cheval assurent incontestablement une immunité très forte et durable contre la toxine, parce que l'immunité antitoxique active ne peut être créée chez les chenilles de la mite des abeilles que seulement par les injections répétées d'anatoxine. Même l'antitoxine a une action curative très nette, si on l'injecte 1 ou 2 jours au plus tard après l'injection d'une dose mortelle de toxine.

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que l'on peut créer l'immunité acquise chez les insectes et qu'elle est très forte contre plusieurs microbes. Nous verrons plus loin que jusqu'à présent on n'a pas relevé l'existence des anticorps chez les insectes, sauf les bactériolysines et une sorte de sensibilisatrice trouvée par HOLLANDE, mais le sang des chenilles vaccinées peut-il, étant injecté aux chenilles neuves, leur conférer l'immunité passive?

En 1927, ZERNOFF a réussi à réaliser l'immunité passive chez les chenilles de *Galleria* contre le microbe de Danysz, en les

inoculant avec le sang des chenilles préalablement vaccinées contre ce microbe.

Presque en même temps, AGHAR et VICHER séparément ont immunisé les chenilles de *Lithosia complana* L. et les chenilles d'une noctuelle d'aubépine contre le *Coccobacillus pieris liquefaciens*, leur injectant du sang de chenilles préalablement immunisées contre ce coccobacille.

Ces auteurs ont établi que trois heures après l'injection du sang des chenilles vaccinées, les chenilles neuves sont déjà immunisées contre la dose mortelle du microbe correspondant.

Depuis, ZERNOFF a étudié beaucoup l'immunité passive chez les chenilles de la mite des abeilles. D'après lui, le sang de chenilles vaccinées possède une action curative, si l'on injecte aux chenilles non immunisées ayant reçu quelque temps avant (de quelques heures à 24 heures), une dose mortelle du microbe correspondant. Si l'intervalle entre l'injection du microbe et le sang des chenilles vaccinées est plus long, l'action curative du sang des chenilles vaccinées est moins nette, car sans doute les lésions produites par les microbes sont trop profondes et déjà irréparables. La plupart des chenilles meurent comme les chenilles témoins, qui ont reçu la même dose de microbes et de sang des chenilles normales.

ZERNOFF a démontré que l'immunité passive dure assez longtemps 5 jours après l'inoculation du sang des chenilles vaccinées, les chenilles sont encore immunisées contre la dose minima mortelle du microbe correspondant.

L'injection du sang des chenilles non immunisées ne confère pas l'immunité passive au même degré que l'injection du sang des chenilles vaccinées, mais cependant après cette injection les chenilles deviennent un peu plus résistantes et dorénavant un certain nombre d'entre elles survit à l'injection des doses mortelles de microbes.

Ce pourcentage est d'ailleurs assez faible comparativement à celui des chenilles ayant reçu le sang des chenilles vaccinées, et il varie suivant le microbe. C'est ainsi que parmi les chenilles ayant reçu le sang des chenilles normales, et ayant été ensuite inoculées avec la dose mortelle du microbe de Danysz, 24 0/0 des chenilles sont restées vivantes, tandis que pour les chenilles injectées avec le sang des chenilles vaccinées contre

ce microbe, le chiffre correspondant est 90 0/0. Les chenilles témoins qui ont reçu seulement la dose mortelle du microbe de Danysz sont toutes mortes. Les chiffres correspondants pour le *Bacterium subtilis* var. *galleriæ* Mét. et Chor. sont 15 0/0, 62 0/0 et 0. Pour le *Coccobacillus acridiorum* 0,60 0/0, 0.

Un fait très intéressant à remarquer est que l'immunité passive marque une spécificité stricte, et même si la spécificité existe, elle n'est encore relevée que dans des limites très larges.

Le sang des chenilles vaccinées avec le bouillon ou avec le microbe de Danysz, ou bien encore avec le *B. subtilis*, ou enfin avec le coccobacille de d'Hérelle, étant injecté confère une immunité aux chenilles neuves contre tous ces microbes, mais à un degré différent.

Ordinairement, c'est l'injection du sang des chenilles vaccinées contre le même microbe qui confère l'immunité passive la plus forte, mais il existe aussi des exceptions, comme par exemple pour le *Coccobacillus acridiorum* : on obtient l'immunité passive plus forte en injectant les chenilles neuves avec le sang de chenilles vaccinées contre le *B. subtilis* var. *galleriæ*.

ZERNOFF a démontré que les substances immunisantes du sang des chenilles vaccinées sont résistantes à la chaleur, elles supportent très bien le chauffage à 60°, et c'est seulement quand la température dépasse cette limite qu'elles commencent à s'affaiblir, cependant la température de 80° ne les détruit pas encore complètement.

Le mécanisme de l'immunité passive chez les insectes reste encore obscur. Les savants qui ont abordé cette question n'ont pas étudié ce qui se passe dans le sang, lors de l'immunisation passive, et le sort du microbe injecté aux chenilles immunisées passivement.

Le mécanisme intime de la défense lors de l'immunisation passive, contrairement à celle de l'immunité active contre les microbes, reste encore inconnu.

L'existence des anticorps (autres que les bactériolysines) ne peut être niée, bien qu'on n'ait pas encore élaboré la technique pour les mettre en évidence, car ZERNOFF a démontré que le plasma et les leucocytes lavés du sang des chenilles vaccinées, employées séparément, confèrent l'immunité passive aussi bien que le sang tout entier.

Quelle est l'origine de ces anticorps ? Nous l'ignorons.

Proviennent-ils des leucocytes détruits au cours de manipulations, comme l'a supposé METCHNIKOFF, ou sont-ils le résultat des changements d'ordre physico-chimique du plasma lui-même survenu au cours de l'immunisation active ?

Moi-même, j'accepte la double origine de ces anticorps. Sans doute les anticorps, comme les bactériolysines non spécifiques contre certains microbes et aussi quelques autres résulte des changements physico-chimiques qui surviennent dans le plasma au cours de l'immunisation active, mais les bactériolysines seules ne peuvent pas assurer l'immunité passive. Il est très probable que les autres anticorps qui agissent dans ce cas et qui restent inconnus jusqu'à présent, proviennent, en partie au moins, des leucocytes détruits, qui, on le sait, sont très fragiles.

Comme nous le verrons, l'immunité chez les insectes est essentiellement cellulaire : ce sont les cellules libres du sang qui digèrent les microbes.

CHAPITRE IV

MÉCANISME DE L'IMMUNITÉ CONTRE LES MICROBES CHEZ LES INSECTES

1° Introduction.

Pour expliquer le mécanisme de l'immunité chez les insectes : nous devons étudier les phénomènes qui se déroulent à l'intérieur de l'organisme, lors d'une infection microbienne chez les insectes immunisés et non immunisés.

On sait que c'est surtout dans le sang que les réactions défensives contre une invasion microbienne se déroulent avec le plus d'intensité.

METCHNIKOFF et ses innombrables adversaires, ont mis brillamment en évidence l'importance des globules blancs du sang dans la défense de l'organisme contre toutes sortes d'infections, chez une série d'animaux inférieurs, et surtout chez les animaux supérieurs et chez l'homme.

EARLICH et ses élèves ont relevé l'importance des réactions humorales, des réactions qui se passent hors des cellules, dans le plasma sanguin lui-même.

Avant d'étudier les réactions de l'immunité, nous allons exposer les faits connus sur la composition du sang des insectes.

Pour simplifier notre exposé, nous avons divisé ces études en deux parties :

1° La cytologie du sang et les réactions cellulaires au cours d'une infection microbienne chez les insectes immunisés, ou non immunisés.

2° Les propriétés et les réactions humorales du sang des insectes.

2° Cytologie du sang des insectes normaux.

Le sang des insectes est un liquide transparent, ordinairement teinté par les divers pigments (du genre des carotinoïdes, chlorophiles, et par d'autres, dont la nature n'est pas encore précisée).

Le sang des insectes ne se coagule pas, il s'oxyde très rapidement à l'air, à cause de l'existence d'une oxydase spéciale (FÜRTH et SCHEIDER) et devient d'une couleur d'un brun noirâtre.

C'est NEWPORT qui, en 1845, a signalé le premier l'existence des éléments cellulaires dans le sang des insectes.

Depuis, GRABER (1871), CATTANES (1889), ont étudié les cellules sanguines du sang des insectes, mais ayant étudié le sang non fixé, ils ne pouvaient pas arriver à des précisions suffisantes. C'est CUÉNOT qui, le premier, a donné la classification, encore bien imparfaite des cellules du sang des insectes.

Depuis les travaux de CUÉNOT, une série de travaux très importants de KOLLMANN, de HOLLANDE, de MÉTALNICOV, de PAILLOT, de ZOTTA, etc., a été publiée.

Chaque auteur a proposé une classification différente, et il en est résulté à présent une certaine confusion dans la classification des amœbocytes du sang des insectes.

Nous tâcherons d'analyser brièvement ces différents travaux, et de tirer un parti utile de toutes les recherches faites sur ce sujet, afin d'adopter une classification unique pour notre exposé ultérieur.

Nous commencerons par les travaux de CUÉNOT. Cet auteur a réparti les amœbocytes du sang des insectes en quatre groupes.

1° Le premier groupe comprend les petites cellules avec un grand noyau qui occupe presque toute la cellule. Le protoplasma est réduit à une mince couche autour du noyau. Ces cellules se divisent activement par karyokinèse. C'est le stade n° 1.

2° Les leucocytes, plus grands ou adultes, qui résultent des divisions des leucocytes n° 1. Ces cellules forment le stade n° 2.

3° Le stade n° 3 comprend les leucocytes dont le protoplasma est chargé de grains acidophiles.

4° Le stade n° 4 comporte les leucocytes du stade n° 3 en voie de dégénérescence.

Cet auteur fait sa classification d'après l'idée que les leucocytes du stade n° 1 donnent naissance aux leucocytes du stade n° 2, et que les leucocytes du stade n° 3 proviennent de ceux du stade précédent.

Cette division des éléments figurés du sang des insectes est encore si imparfaite qu'on ne peut pas l'utiliser dans la pratique.

KOLLMANN, dans son travail détaillé, confirme les résultats de CUÉNOT, et donne des précisions nouvelles sur la dégénérescence des leucocytes.

HOLLANDE, dans ses deux mémoires très documentés sur le sang des insectes, publiés en 1909 et 1911, distingue cinq groupes de cellules.

1° *Proleucocytes* ou jeunes leucocytes à protoplasme basophile avec le grand noyau qui occupe presque toute la cellule.

D'après HOLLANDE, les autres groupes de cellules évoluent à partir de ces éléments.

2° *Phagocytes*, cellules plus grandes que les proleucocytes avec le protoplasme, très hyalin. Ces éléments sont parfois ronds, parfois fusiformes.

3° *Leucocytes granuleux*, de forme le plus souvent allongée, rarement ovale et dont le protoplasme est chargé de granulations chromophiles.

On ne trouve pas ces cellules chez un grand nombre d'insectes ; l'auteur les a trouvées dans le sang des chenilles de *Hypomeceta*.

4° *Ofnocytoïdes*, grandes cellules ordinairement d'une forme ovale ; elles ont un petit noyau qui se trouve toujours près d'un bord des cellules, le protoplasme acidophiles fortement hyalin. Ces cellules ne jouissent pas de la propriété d'englober les microbes.

5° *Cellules à sphérules*, rondes ou ovales, dont le protoplasme est bourré par les sphérules acidophiles dans les cellules jeunes et basophiles dans les cellules plus âgées.

PAILOT distingue quatre types de cellules.

1° *Les macronucléocytes* sont d'une forme arrondie (au moins dans le corps des insectes), possédant un grand noyau et une

mince couche de protoplasme dense, qui se colore fortement en bleu foncé par le colorant de GIEMSA. Les micronucléocytes correspondent aux proleucocytes de HOLLANDE.

2° *Les micronucléocytes* ont un noyau plus petit, constitué par les grains des chromatines visiblement séparés; le cytoplasme est beaucoup plus abondant, se colore en bleu pâle par le Giemsa. On trouve parfois des granules acidophiles très fins dans le cytoplasme de ces cellules. Les micronucléocytes correspondent aux phagocytes de HOLLANDE.

3° *OEnocytoïdes*, correspondent à l'œnocytoïde de HOLLANDE.

4° *Micronucléocytes granuleux*, sont les cellules à sphérules de HOLLANDE.

Mme HUFNAGEL a étudié le sang de *Hyponomeuta padella* L. et a donné une classification analogue à celle de HOLLANDE.

K. MULLER a étudié le sang des abeilles, et il a distingué aussi quatre groupes de cellules.

MÉTALNICOV a beaucoup étudié le sang de diverses chenilles, surtout des chenilles de *Galleria mellonella* L., et distingue six groupes de cellules :

1° *Lymphocytes* sont des éléments à gros noyau et une mince couche de protoplasme colorable en bleu foncé par bleu d'Unna et par Giemsa.

2° *Proleucocytes* sont des cellules plus grandes avec un gros noyau et avec une couche de protoplasme assez large, colorable en bleu foncé par les colorants mentionnés.

La limite entre ces deux groupes de cellules n'est pas très nette, et parfois il est difficile de se rendre compte, si c'est un lymphocyte ou un proleucocyte.

Ces deux groupes correspondent aux proleucocytes de HOLLANDE et aux micronucléocytes de PAILLOT.

3° *Leucocytes ou phagocytes vrais*, grands éléments avec un noyau beaucoup plus petit que chez les cellules des deux premiers groupes, avec une large couche de protoplasme, colorable en bleu pâle par le bleu polychrome ou par le Giemsa. Le protoplasme de ces cellules est parfois chargé par des inclusions éosinophiles très fines.

Ce groupe de cellules correspond aux phagocytes de HOLLANDE et aux macronucléocytes de PAILLOT.

4° *OEnocytes*, correspondant aux œnocytoïdes des auteurs précédents.

5° *Cellules sphéruleuses*, correspondantes aux cellules à sphérules de HOLLANDE et aux micronucléocytes granuleux de PAILLOT.

6° *Cellules sphéruleuses vides*. Ce sont les cellules à sphérules qui ont perdu leurs granules, et alors le protoplasme se présente sous l'aspect vacuolaire. On trouve tous les stades de transition entre le type 5 et le type 6.

Pour voir plus aisément la différence qui existe entre les diverses classifications des amœbocytes des insectes, nous donnerons ici un tableau où nous avons consigné tous ces systèmes.

D'après ce tableau, on voit que la différence qui existe entre les classifications des divers auteurs (excepté celle de CUÉNOT, qui est encore très imparfaite) n'est pas en réalité tellement grande.

On peut distinguer quatre groupes de cellules bien définis.

Dans le premier groupe rentrent les proleucocytes de HOLLANDE ; proleucocytes et jeunes leucocytes de HUFNAGEL ; lymphocytes et proleucocytes de MÉTALNICOV, et les micronucléocytes de PAILLOT.

D'après ces auteurs, ce sont les cellules à gros noyau, riches en chromatine, avec une mince couche de protoplasme basophile, colorables en bleu foncé par le colorant de Giemsa.

Comme nous l'avons indiqué, il n'existe pas une différence bien nette entre les lymphocytes et les proleucocytes de MÉTALNICOV, et on trouve tous les stades de transition entre ces deux groupes de cellules.

D'ailleurs MÉTALNICOV lui-même ne distingue pas toujours ces deux groupes, quand il fait la numération des cellules.

Il nous semble qu'il est plus pratique de désigner ces groupes de cellules sous le nom de macronucléocytes, qui indique bien le caractère de ces cellules.

A présent, tous les auteurs sont d'accord que les macronucléocytes sont aptes à phagocyter.

Dans le deuxième groupe, on peut ranger les phagocytes de HOLLANDE, de MÉTALNICOV et de HUFNAGEL et le micronucléocyte de PAILLOT.

Les leucocytes granuleux que HOLLANDE a trouvé chez les

Classification des amœbocytes des insectes					
Groupe	d'après CuÉNOT	d'après HOLLANDÉ	d'après HUFNAGEL	d'après MÉTALNICOV	d'après PAILLOT
N° 1					
N° 1	4° Stade n° 1	4° Proleucocytes	1° Proleucocytes 2° Jeunes leucocytes	1° Lymphocytes 2° Proleucocytes	1° Macronucléocytes
N° 2	2° Stade n° 2 3° Stade n° 3	2° Phagocytes 3° Leucocytes granuleux	3° Phagocytes ou leucocytes âgés.	3° Phagocytes ou leucocytes	2° Micronucléocytes
N° 3	—	4° OEnocytoïdes	—	4° OEnocytes	4° OEnocytoïdes (OEnocytes)
N° 4	—	5° Cellules à sphérules	4° Leucocytes à granules	5° Cellules sphéruleuses 6° Cellules sphéruleuses vides	5° Micronucléocytes granuleux
N° 5	4° Stade n° 4. Les leucocytes en voie de dégénérescence	—	—	—	—

chenilles de *Hypanomeuta* n'existent pas chez un grand nombre d'insectes, mais ils rentrent bien dans ce groupe, car la différence entre ces deux sortes de cellules est assez petite, et on trouve souvent dans les phagocytes des granulations acidophiles très fines, surtout dans les cas pathologiques (chez les chenilles de *Galleria*, on les trouve en abondance après l'injection de la toxine diphtérique).

Nous avons adopté le nom de *miconucléocytes* pour ce genre de cellules.

Dans le troisième groupe, nous avons désigné les cellules sous le nom d'*OEnocytoïdes*, comme l'a fait HOLLANDE, afin de ne pas les confondre avec les œnocytes vrais de WIELOWIESKI, cellules particulières fixées par un prolongement au cordon graisseux extérieur.

Pour le quatrième groupe, nous avons adopté le nom des *cellules à sphérules* qui indique bien le caractère particulier de ces cellules.

C'est ainsi que nous avons obtenu les groupes suivants :

1° Macronucléocytes.

2° Miconucléocytes.

3° OEnocytoïdes.

4° Cellules à sphérules.

La dimension des cellules varie dans une mesure assez large, d'une espèce d'insectes à l'autre.

Ordinairement les miconucléocytes sont plus grands que les macronucléocytes, mais chez les chenilles de la Pyrale du Maïs, c'est l'inverse (MÉTALNICOV et CHORINE).

Les cellules à sphérules ont ordinairement un grand nombre de granules, mais il y a des cas où il existe seulement un ou quelques granules. Ces granules sont formés par les substances protéiques, mais leur composition plus intime, ainsi que le rôle qu'ils jouent dans l'économie, sont actuellement inconnus.

3° Formule leucocytaire.

La formule leucocytaire du sang des insectes normaux varie forcément d'un animal à un autre de la même espèce, et surtout d'une espèce à l'autre, mais les recherches effectuées par

MÉTALNICOV, TATEIWA et AGHAR, ont montré que cette variation n'est pas tellement grande, et la formule leucocytaire conserve à peu près le même type chez la plupart des chenilles.

Formule leucocyte du sang des chenilles de Galleria.

	D'après MÉTALNICOV	D'après TATEIWA
Micronucléocytes .	45,40 0/0	59,20 0/0 (varie de 53,8 à 63,8)
Macronucléocytes .	50,40 0/0	33,50 0/0 (varie de 30,0 à 37,5)
OEnocytoïdes .	4,20 0/0	5,90 0/0 (varie de 2,9 à 8,1)
Cellules à sphérules .	0	1,40 0/0 (varie de 0,9 à 2,5)

TATEIWA a trouvé que la formule est très stable et ne varie même pas sensiblement, si on laisse les chenilles à jeun pendant 8 à 9 jours.

Dernièrement, AGHAR a fait de nombreuses numérations des cellules sanguines de plusieurs espèces de chenilles, et il a trouvé les chiffres moyens suivants :

Micronucléocytes varient de 42 à 56 0/0.

Macronucléocytes varient de 20,70 à 37,50 0/0.

OEnocytoïdes varient de 0 à 36 0/0.

Cellules à sphérules varient de 1 à 6 0/0.

D'après les chiffres obtenus par ces trois auteurs, on voit que dans le sang des chenilles normales adultes :

Les macronucléocytes varient de 30 à 63,80 0/0.

Les micronucléocytes varient de 20 à 45 0/0.

Les œnocytoïdes varient de 0 à 6 0/0.

Les cellules à sphérules varient de 0 à 36 0/0.

On ne trouve pas d'œnocytoïdes ni de cellules à sphérules chez tous les insectes.

La formule leucocytaire varie largement avec l'âge de l'insecte, mais à notre connaissance, il n'existe pas de travaux spéciaux sur ce sujet.

On sait que le sang des chenilles jeunes est très riche en macronucléocytes. On les trouve en quantité, 90 0/0 et même plus. Chez les insectes âgés, au contraire, ce sont les micronucléocytes qui deviennent plus nombreux.

Le nombre des éléments figurés dans le sang varie largement. Pour les chenilles de *Galleria* nous avons trouvé (avec le hématimètre de MALLASSEZ) des chiffres inclus entre 2.700 et 19.000.

AGHAR a trouvé pour les chenilles des diverses espèces des nombres variant de 2.500 à 12.000.

Naturellement le nombre des leucocytes varie sensiblement selon les différents stades de la vie de l'insecte (mues, nymphe, etc.).

4° La réaction des cellules sanguines des insectes normaux au cours d'une infection microbienne.

Nous avons vu la composition du sang des insectes normaux. Que se passe-t-il si nous injectons dans le sang d'une chenille normale un microbe quelconque ? Comment varie, dans ce cas, la formule leucocytaire ?

Ce sont surtout TATEIWA, MÉTALNICOV et AGHAR, qui ont étudié cette question. En comparant les chiffres donnés par ces auteurs, on voit que les divers microbes provoquent une réaction d'un type unique qui varie en intensité et en rapidité, suivant le microbe injecté et aussi suivant l'espèce de l'insecte.

Les microbes injectés provoquent :

Premièrement, une diminution rapide des micronucléocytes ; parfois en ne trouve plus que 4 ou 5 0/0 de ces cellules, au lieu de 30 ou 40 0/0 quelques heures après l'injection.

Deuxièmement, le nombre de macronucléocytes croît rapidement et peut atteindre parfois 90 0/0 et plus.

Troisièmement, les cellules à sphérules, dont le rôle est encore inconnu, apparaissent en nombre de plus en plus grand. Leur nombre peut atteindre parfois 58 0/0 au lieu de 3 0/0 (chenilles de *Pyrausta*).

Ces réactions commencent à se manifester aussitôt après l'injection. Elles progressent en intensité pendant 10 à 48 heures et décroissent un ou deux jours après. La formule leucocytaire redevient alors normale. Le nombre des œnocytes ne varie pas.

A titre d'exemple, nous citerons la variation des éléments

sanguins chez les chenilles de *Pyrausta nubilalis* Hbn. après l'injection de *B. subtilis galleriæ*.

	Avant l'expé- rience	1 heure après	2 h. 1/2 après	6 heures après	9 h. 1/2 après	21 heures après
Macronucléocytes	36 0/0	36 0/0	60 0/0	47 0/0	49 0/0	26 0/0
Micronucléocytes	60 0/0	54 0/0	26 0/0	36 0/0	15 0/0	56 0/0
Cellules à sphérules.	4 0/0	10 0/0	14 0/0	17 0/0	36 0/0	18 0/0

(MÉTALNICOV et CHORINE).

Nous n'avons pas indiqué les œnocytes parce qu'ils sont très rares, et de plus qu'ils ne participent pas à la réaction cellulaire.

« Ce qui est frappant, c'est la rapidité de la réaction cellulaire. On sait que les chenilles n'ont pas d'organes lymphatiques, et dans ce cas, d'où proviennent les cellules nouvelles ? »

Il est difficile d'admettre la possibilité de la formation de nouvelles cellules dans un délai aussi bref. Il est plus vraisemblable de supposer que les cellules se modifient elles-mêmes sous l'influence de quelque excitant.

Il est possible que cette modification de la formule leucocytaire, et surtout l'apparition de leucocytes granuleux ou sphéruleux, s'expliquent principalement par la réaction du protoplasme » (MÉTALNICOV et CHORINE).

Le nombre des éléments figurés dans le sang après l'injection diminue sensiblement pendant un ou deux jours après, mais redevient bientôt normal.

C'est ainsi que nous avons trouvé chez les chenilles de *Galleria*, avant l'injection, 16.000 amœbocytes pour 1 millimètre cube. 24 heures après l'injection d'une dose non mortelle de *B. subtilis galleriæ*, je n'en ai plus trouvé que 3.600.

PAILLOT a observé une division intense des leucocytes 24 à 48 heures après l'injection des microbes. C'est peut-être la cause de la production de nouveaux leucocytes ; ou peut-être, les leucocytes qui ont englobé des microbes toxiques, et, abimés par ce fait, se fixent-ils pour un certain temps, et ne réapparaissent-ils dans le sang, qu'après un retour à leur état normal.

5° Réactions cellulaires chez les insectes immunisés.

Comment réagissent les amœbocytes des insectes préalablement immunisés contre les injections des microbes ?

MÉTALNICOV, en collaboration avec GASCHEN, a démontré que les réactions cellulaires chez les insectes immunisés, restent du même type, mais ce qui est très important, deviennent sensiblement plus intenses et se déroulent beaucoup plus rapidement que chez les insectes normaux. Souvent le maximum de l'intensité de la réaction est déjà atteint au bout de 30 à 60 minutes, au lieu de 5 à 6 heures, comme chez les insectes non immunisés.

Nous reviendrons encore sur ce fait capital, quand nous allons parler de la phagocytose.

6° Destruction des microbes par l'organisme de l'insecte.

Comment se défendent les insectes contre les microbes qui ont pénétré dans leur corps ?

Les recherches de HOLLANDE, d'AGHAR, de PAILLOT, et surtout de MÉTALNICOV et de ses élèves, ont démontré que l'organisme dispose à cet égard de moyens différents.

Nous allons exposer plus loin, l'un après l'autre, les phénomènes qui se succèdent.

Premièrement : il faut mentionner la phagocytose, phénomène fondamental dans la défense de l'organisme contre les microbes, aussi bien chez les animaux supérieurs, que chez les invertébrés.

Deuxièmement : la formation des cellules géantes et des capsules, dans le cas où le microbe n'est pas facile à détruire par les leucocytes.

Troisièmement : l'élimination des microbes par la formation d'abcès.

A. — *Phagocytose.*

a) Chez les insectes normaux. — Si nous injectons une chenille avec un microbe exempt de virulence pour l'insecte donné, et que différents laps de temps après, nous prélevons

une petite goutte de sang, pour préparer des frottis colorés, nous verrons sur ces frottis, que parfois au bout déjà de quelques minutes, les leucocytes commencent à englober les microbes.

La phagocytose augmente vite, et deux ou trois heures après, elle atteint son intensité maxima. Si la dose n'est pas très forte, on voit que tous les microbes sont déjà englobés, et on ne les trouve plus dans le plasma du sang.

Nous avons vu qu'on peut distinguer quatre types de cellules sanguines chez les insectes. A quel groupe appartiennent les cellules qui sont douées de la faculté de phagocytose ?

PAILLOT, dans ses premiers travaux, croyait que les micronucléocytes seuls pouvaient englober les microbes, mais les travaux de MÉTALNICOV ont démontré que les macronucléocytes peuvent aussi phagocyter les microbes, bien que moins intensivement que les micronucléocytes. HOLLANDE, AGHAR, et les élèves de MÉTALNICOV, ont apporté leur appui au fait observé par MÉTALNICOV. D'ailleurs à présent, PAILLOT est arrivé à une conclusion analogue.

C'est ainsi que maintenant tous les auteurs sont d'accord que ce sont les micronucléocytes et les macronucléocytes qui jouissent de cette propriété.

Les cellules à sphérules et les œnocytoïdes ne peuvent pas phagocyter. Cependant d'après AGHAR, les œnocytoïdes peuvent aussi englober certains microbes (bacille de Koch), mais ces observations ne sont pas d'accord avec celles des autres auteurs et doivent être confirmées encore par des recherches ultérieures.

Dans les constatations de ce genre, il y a toujours la possibilité d'une erreur, car les bacilles peuvent se trouver dans le plasma, au-dessous ou au-dessus des leucocytes, et après la dissémination des frottis se trouver collés sur la surface des cellules. Cela arrive d'autant plus souvent que l'émulsion microbienne injectée est plus épaisse.

Maintenant, nous allons examiner de plus près le phénomène de phagocytose.

Si nous injectons un microbe peu virulent, nous voyons qu'au bout de trois heures ordinairement, il ne reste plus de microbes libres dans le sang : ils sont tous phagocytés, et quelques

jours après, ils sont tous digérés par les leucocytes et l'insecte redevient à son état normal.

Dans ce cas, l'index phagocytaire croît vite, atteint son maximum de 2 à 4 heures après l'injection, et décroît très rapidement.

Maintenant, si nous injectons une forte dose de microbes à endotoxines plus virulentes pour les insectes, dans ce cas, nous constatons que l'animal meurt parfois quelques jours après bien que la phagocytose puisse être intense.

Cependant nous ne trouverons pas de microbes libres dans le sang : ils sont tous phagocytés, et en partie digérés. C'est le phénomène de mort stérile observé par MÉTALNICOV chez les chenilles de *Galleria*, après injection de certaines souches de staphylocoque, de sarcines et de vibrion cholérique.

Ici au moment de la destruction des microbes par les leucocytes, les endotoxines commencent à se libérer et intoxiquent l'organisme.

Si nous injectons les chenilles de *Galleria* avec le charbon virulent, nous voyons que les éléments microbiens sont vite phagocytés. Cependant les leucocytes sont incapables de les détruire et, intoxiqués par les microbes, se désagrègent, mettent en liberté les microbes qui commencent à se développer dans le sang, et tuent l'animal.

Dans d'autres cas, l'injection des microbes possédant des endotoxines fortes paralyse très vite les leucocytes et la phagocytose à peine commencée, cesse ; les microbes se multiplient sans obstacle et amènent la mort de l'insecte (*B. coli*, *B. proteus*, etc...).

Parfois, après l'injection de certains microbes, la phagocytose fait défaut, et les microbes ne rencontrant aucun obstacle se développent intensivement.

Pour les chenilles de *Galleria*, c'est le cas de *B. galleriæ* n° 1 et de *B. galleriæ* n° 2. Ces deux microbes sont très intéressants et montrent quelle est l'importance de la phagocytose.

B. galleriæ n° 1, isolé par MÉTALNICOV en 1922, n'était pas phagocyté par les leucocytes de *Galleria*. Toutes les tentatives que nous avons faites pour immuniser les chenilles de *Galleria* contre ce microbe, ont échoué.

Nous avons essayé les vaccins préparés avec des microbes

chauffés, de cultures très vieilles. Nous avons essayé de les immuniser par les doses minimales de culture virulente, par le filtrat de culture en bouillon, etc., mais sans aucun succès : les chenilles ne devenaient pas plus résistantes envers ce microbe.

Ces expériences ont été faites en 1926. Deux ans après, nous avons repris ces expériences, et nous avons réussi du premier coup à immuniser les chenilles contre le *B. galleriæ* n° 1.

Quand nous avons étudié les frottis du sang des chenilles infectées, nous avons constaté alors que le microbe, affaibli par de nombreux passages en milieu artificiel, était *phagocyté*.

Nous avons parlé plus haut des expériences avec le *B. galleriæ* n° 2. C'est un des microbes les plus virulents pour les chenilles de *Galleria*, et ni MÉTANILCOV, ni ISCHIMORI, ni moi, n'avons réussi à immuniser les chenilles contre ce microbe. Les leucocytes de *Galleria* ne peuvent pas phagocyter ce microbe.

En 1927, nous avons obtenu une race asporogène affaiblie de ce microbe, et, en l'utilisant comme vaccin, nous avons pu immuniser ces chenilles contre la race affaiblie, ainsi que contre la race initiale très virulente.

Ici, nous avons constaté que lorsque nous injectons les microbes de la race asporogène, aussitôt les leucocytes commencent à les englober, et les digèrent en quelques jours. Les leucocytes des chenilles ainsi immunisées deviennent dorénavant aptes à phagocyter les éléments microbiens de la race virulente.

Ces deux exemples nous montrent avec évidence que l'immunisation n'est seulement possible que lorsque les microbes peuvent être phagocytés.

Par les différents exemples cités plus haut, on voit clairement un parallèle frappant entre la phagocytose et la virulence du microbe. On peut dire, que plus la phagocytose est faible, plus le microbe est virulent pour l'insecte auquel il a été administré.

b) Réaction de contact. — La destruction des microbes peut se passer non seulement à l'intérieur des leucocytes, mais parfois aussi hors des cellules, au contact immédiat de ceux-ci. CHATTON a étudié la *Treponema drosophilæ*, parasite

intestinal de *Drosophiles*. Les cellules lésées de l'intestin des *Drosophiles* ont une action agglutinante et lytique sur ce tréponème.

MÉTALNICOV a étudié la destruction des bactéries charbonneuses par les chenilles de *Galleria*. Les bacilles phagocytés augmentent, se déforment et se dissolvent peu à peu, mais le gonflement des microbes a eu lieu, non seulement à l'intérieur des phagocytes, mais aussi à leur contact immédiat.

c) La phagocytose chez les insectes immunisés. — Nous avons passé en revue les principaux faits de la phagocytose chez les insectes normaux.

Comment se passe la phagocytose chez les chenilles immunisées?

MÉTALNICOV a démontré que la phagocytose est beaucoup plus précoce et beaucoup plus intense chez les insectes immunisés, tandis que chez les chenilles de *Galleria* normales, l'index phagocytaire atteint son maximum au bout de 2 à 4 heures, chez les chenilles immunisées on observe l'index phagocytaire maxima au bout de 20 à 40 minutes, et, ordinairement, il est beaucoup plus fort chez les animaux immunisés.

Tout le monde est d'accord sur l'observation de CANTACUZÈNE qui dit : « Les chances de guérison de l'animal sont directement proportionnelles à l'énergie et surtout à la précocité de la phagocyte ».

L'explication de l'immunité acquise se trouve alors dans l'exaltation de l'activité des phagocytes qu'ils subissent au cours de l'immunisation.

B. — Formation des cellules géantes et des capsules.

Si nous injectons les chenilles avec un microbe ou une substance quelconque difficile à digérer par les leucocytes, on observe alors un fait particulier qui fut étudié chez les insectes en premier par MÉTALNICOV. Les cellules qui ont phagocyté des microbes commencent à s'agglutiner et forment des amas parfois considérables, qu'on a désignés sous le nom de cellules géantes.

Les microbes peuvent alors rester parfois longtemps vivants,

mais ils sont isolés de l'organisme, à l'intérieur de ces cellules géantes.

Les macronucléocytes, aussi bien que les micronucléocytes, participent à la formation de ces cellules géantes.

Parfois, le phénomène en reste là et ne progresse pas, comme par exemple, après l'injection des bacilles lépreux aux chenilles de *Galleria* : mais le plus souvent les cellules géantes s'entourent d'une couche compacte de leucocytes, qui affluent de toutes parts vers la périphérie de la cellule géante. Elles forment alors une capsule qui isole complètement les microbes englobés, ceux-ci subissent lentement la dégénérescence sous l'action des leucocytes, et se transforment en une masse d'un brun foncé.

MÉTALNICOV a observé ce fait la première fois, après l'injection du bacille de Koch aux chenilles de *Galleria*.

Ces chenilles vivent dans les ruches et se nourrissent aux dépens de la cire et des restes de substances albuminoïdes et de sucres qu'on trouve toujours dans les alvéoles (de cire).

Le sang de *Galleria* est assez riche en lipase, comme l'ont démontré MÉTALNICOV, FIESSINGER et PERTZEFF, et cet insecte peut digérer les bacilles tuberculeux beaucoup plus rapidement que les autres, parce que la lipase attaque les substances cireuses que contiennent les bacilles acido-résistants.

La plupart des autres insectes sont aussi réfractaires envers les injections de bacilles tuberculeux, mais, chez eux, les bacilles restent parfois non digérés, dans les capsules pendant plusieurs mois, comme TOUMANOFF l'a observé chez le *Dixippus morosus*, tandis que chez les chenilles de *Galleria*, ils sont digérés au bout de quelques jours.

On observe très souvent la formation de capsules après l'injection de substances, même non toxiques, comme l'encre de chine, le carmin, etc.

Ce phénomène a une portée générale et cependant il passe souvent inaperçu des savants qui travaillent sur ce sujet, peut-être parce qu'il n'est possible d'étudier ce phénomène que par la méthode de coupes, tandis que plusieurs auteurs n'ont étudié les réactions cellulaires chez les insectes que par la méthode des frottis préparés avec une goutte de sang prélevé.

WHITE, en 1923, a observé chez les chenilles d'*Agrotis* la

formation de capsules typiques provoquées par le *Bacillus noctuarum* et le *Bacillus sphingidis* (White) au cours d'une épizootie causée par ces microbes.

Dernièrement, ECKSTEIN a fait des expériences très intéressantes sur la formation de capsules chez les insectes. Cet auteur a particulièrement étudié la production de la mélanine lors de l'infection chez les insectes.

C. — *Elimination des microbes
par le moyen de la formation d'abcès.*

SOUSLOFF, en 1906, a observé chez des grillons injectés avec de l'encre de chine un processus qui rappelle beaucoup celui de l'infection de la peau chez les animaux supérieurs.

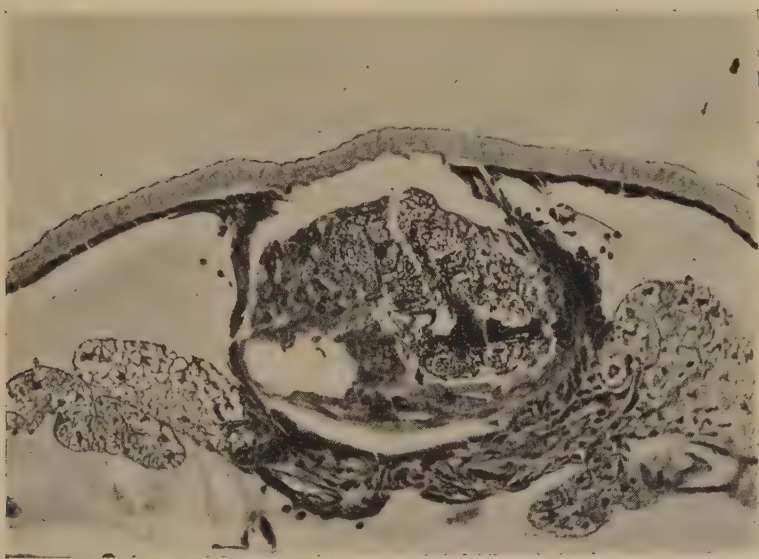


Fig. 2.

Il a remarqué que les leucocytes chargés d'encre de chine se dirigent vers l'hypoderme, et de là, vers l'extérieur, sous la cuticule.

MÉTALNICOV a observé des faits analogues chez les chenilles

de *Galleria*, après l'injection de *B. perfringens* et de charbon.

Ces processus sont assez rares et ne se produisent qu'avec quelques espèces microbiennes.

Nous avons observé ces phénomènes chez les chenilles de *Galleria*, après l'injection de *B. thirotrix*.

Les microbes injectés sont vite phagocytés par les leucocytes, qui bientôt commencent à s'agglutiner et à former les cellules géantes typiques.

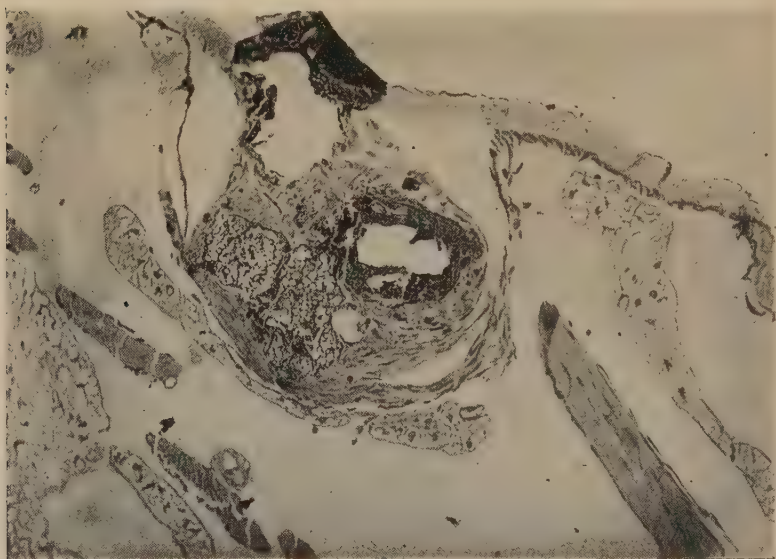


Fig. 3.

Ces amas de cellules bourrées de microbes se déplacent vers la périphérie du corps des chenilles, et quand ils se trouvent en contact immédiat avec l'épiderme, commencent à s'isoler du corps par une couche épaisse des cellules.

On observe ces phénomènes les deux ou trois premiers jours (Fig. 2).

A ce moment, on remarque sur la chitine de chenilles des petites taches noires d'un ou deux millimètres de diamètre, qui correspondent aux amas des cellules fixées sur l'hypoderme.

Les leucocytes des cellules géantes et les microbes inclus commencent à dégénérer, ainsi que la couche de l'hypoderme, qui sépare les amas de leucocytes de la chitine, les cellules ne se colorent plus normalement. La chitine à cet endroit commence à dégénérer; elle devient d'abord d'un jaune brunâtre, et quelque temps après se détache complètement (Fig. 3).

Les cellules géantes dégénérées, remplies de microbes, sont éliminées de l'organisme.

Après la mue suivante, on ne remarque aucune lésion chez ces chenilles.

Nous avons donné ici deux photographies de l'abcès chez les chenilles de *Galleria*.

Nous n'avons observé la formation des abcès qu'avec une seule couche de *B. thirotrix*, que M. ROSENTHAL nous a aimablement fournie (et comme nous l'avons déjà mentionné, la virulence d'une espèce microbienne varie largement pour les insectes, d'une souche à l'autre).

7° Propriétés humérales du sang des insectes.

D'après les travaux de BUCHNER, d'ERLICH et surtout d'après ceux de BORDET, on a distingué dans le sérum du sang des animaux supérieurs, deux substances :

1° *Alexine*, qui existe dans le sérum des animaux normaux, aussi bien que dans celui des animaux malades et immunisés.

2° *Sensibilisatrice*, qui est un anticorps produit par la présence d'un microbe dans l'organisme.

HOLLANDE a démontré que le sang des insectes ⁽¹⁾ est dépourvu d'alexine, et ce fait a été confirmé par MÉTALNICOV.

MÉTALNICOV et AGHAR n'ont pas pu relever l'existence de la sensibilisatrice chez les insectes. Aussi voyons-nous que les propriétés humérales du sang des insectes varient sensiblement de celles des animaux supérieurs.

Dans le sang des insectes normaux, on ne trouve jamais, ni

(¹) Le sang des insectes ne se coagule que par le contact immédiat avec l'air sous forme de pellicule, et toutes les expériences sur les réactions humérales ont été faites avec la partie liquide du sang des insectes, comparable plutôt, non au sérum, mais au plasma des animaux supérieurs.

hémolysine contre les globules rouges des animaux supérieurs, ni agglutinine contre les microbes, ni précipitine, ni opsonine.

On n'est pas arrivé non plus à faire paraître cette substance par immunisation préalable.

Sauf l'agglutinine contre un coccobacille, que GLASER a observé chez les criquets immunisés envers ce microbe.

Ces faits n'ont pas été observés par les autres auteurs.

Jusqu'à présent, on n'a trouvé que des bactériolysines contre un certain nombre de microbes.

PAILLOT les a mises en évidence pour les divers coccobacilles isolés des insectes, et MÉTALNICOV pour le vibron cholérique, et le bacille dysentérique de SHIGA.

Dernièrement, ZERNOFF a étudié en détail les bactériolysines contre le microbe de Danysz.

Les microbes injectés se transforment d'abord en granules qui se dissolvent peu à peu.

Parfois, quand la dose de microbes injectée est assez forte, on observe un fait très curieux, analogue à ce que nous avons décrit pour la phagocytose : les microbes détruits mettent en liberté la toxine qu'ils contiennent et intoxiquent l'organisme de l'insecte, de telle sorte que les chenilles meurent sans avoir de microbes dans le sang : tous les microbes sont déjà dissous. C'est la mort stérile observée par M. MÉTALNICOV, après l'injection aux chenilles de *Galleria* du vibron du choléra et du bacille dysentérique de SHIGA.

Il est très intéressant de constater que les bactériolysines sont beaucoup plus intenses chez les insectes préalablement immunisés, et les bactériolysines surtout deviennent beaucoup plus précoces dans ce cas, comme la démontré MÉTALNICOV.

Si chez les chenilles injectées avec le vibron cholérique, la bactériolyse atteint son intensité maxima au bout de une ou deux heures, chez les chenilles préalablement immunisées, elle est déjà atteinte au bout de 15 à 30 minutes, fait que nous avons observé pour la phagocytose.

Dans le sang des insectes immunisés, il existe encore quelques autres anticorps : l'anatoxine que nous avons trouvée après les injections répétées d'anatoxine diphtérique de RAMON, et dont nous allons parler plus loin.

Nous avons indiqué qu'on peut créer l'immunité passive chez

les insectes neufs par l'injection du sang des chenilles préalablement immunisées.

Le plasma confère l'immunité, aussi bien que le sang entier, ou les leucocytes lavés : il est donc évident que le plasma contient des anticorps qui peuvent immuniser les insectes neufs, et même possèdent une propriété curative (ZERNOFF).

HOLLANDE et VICHER ont démontré que les microbes traités pendant 24 heures par le sérum des chenilles immunisées, et ensuite lavées avec l'eau physiologique, ne provoquent pas la mort des insectes, même à dose assez forte, mais au contraire les immunisent très bien contre l'injection suivante de dose mortelle de ce microbe normal.

ECKSTEIN dans deux travaux très intéressants a étudié les réactions humorales lors d'une infection chez les insectes, surtout au point de vue de formation de la mélanine. Cet auteur croit que la production de la mélanine est une réaction de défense de l'organisme.

Comme J. CANTACUZÈNE le remarque justement, les méthodes pour l'étude des phénomènes humorales chez les Invertébrés doivent être différentes de celles employées pour les recherches sur les animaux supérieurs. Comme les réactions humorales sont les réactions de précipitation de colloïdes. Au point de vue physico-chimique, le sang des Invertébrés varie sensiblement suivant le groupe systématique et diffère surtout du sang des Vertébrés, animaux à température constante du corps.

Comme les méthodes élaborées au cours des recherches sur les animaux supérieurs ne sont peut-être pas applicables pour les expériences sur les invertébrés : il faut, d'une part, chercher des méthodes nouvelles pour mettre en évidence les réactions colloïdales chez les invertébrés, et, d'autre part, étudier le sang de ces animaux au point de vue physico-chimique, comme l'ont fait FRÉDÉRICQ et BOTTAZI, et surtout Mlle DAMBOVICIANU, qui étudie les sérums de quelques animaux marins (*Astacus fluviatilis*; *Maia aquinada* *Cancer pagurus*, etc...) normaux et immunisés.

Bactériophage. — F. d'HÉRELLE a démontré l'importance que peut avoir le bactériophage dans la lutte contre certaines maladies microbiennes chez les animaux supérieurs.

Cet auteur a isolé des vers à soie malades un bactériophage

anicoccobacillaire contre le coccobacille qui a été cause de cette maladie.

Un fait très important est que d'HÉRELLE a trouvé le bactériophage seulement dans le contenu intestinal des vers qui ont été le moins gravement malades. Il n'a jamais constaté la présence du bactériophage chez les vers très malades ou chez les vers qui avaient succombé à la maladie.

Ce parallélisme entre la gravité de la maladie et l'absence de bactériophage a fait penser à l'auteur que le bactériophage a une action curative.

VICHER a cherché les bactériophages chez de nombreuses espèces d'insectes normaux et malades : il n'a jamais pu les découvrir.

De même, nos recherches personnelles n'ont donné que des résultats négatifs, et le fait observé par d'HÉRELLE reste pour le moment isolé.

CHAPITRE V

IMMUNITÉ ACQUISE CONTRE LES SUBSTANCES SOLUBLES

Immunité active.

1° *Introduction.* — L'immunité antitoxique a été très peu étudiée chez les Invertébrés.

Dans le chapitre sur l'immunité naturelle, nous avons indiqué que les invertébrés sont en général très résistants envers les toxines les plus dangereuses pour les animaux supérieurs.

METCHNIKOFF, en inoculant les larves de *Oryctes nasicornis* et les scorpions avec les toxines tétaniques n'a pas pu relever de production d'antitoxine. Ce cas est assez spécial : comme METCHNIKOFF l'a démontré, la toxine tétanique est complètement inoffensive pour les larves d'*Oryctes*, inoculée elle reste inabsorbée dans le sang pendant un temps assez long, ne déclanchant aucune réaction organique.

Nous avons vu que chez les larves et les mouches de *Lucilia caesar* L. et *Chrysomya macellaria*, la toxine botulinique restait dans le sang pendant quelques semaines sans être détruite, car elle n'est pas toxique pour ces insectes, et ne provoque de plus aucune réaction de l'organisme, mais on connaît quelques cas dans lesquels les tissus des invertébrés accusent un pouvoir antitoxique naturel ou un pouvoir empêchant vis-à-vis des ferments.

C'est ainsi que METCHNIKOFF a démontré que le sang de scorpion possède un pouvoir antitoxique assez fort contre le propre venin de cet animal. Chez les araignées, le sang est douée d'une propriété neutralisante contre leur propre venin.

On connaît chez les vers parasites intestinaux des antiferments qui leur permettent de résister à l'action de sucs digestifs de l'hôte, etc..

2° *Immunité contre la toxine diphtérique.* — Nous avons cherché une toxine qui puisse être mortelle pour les chenilles de *Galleria mellonella*, et comme nous l'avons déjà dit, c'est la toxine diphtérique qui présente une toxicité assez élevée pour cet insecte.

Nous avons déjà indiqué que 1/500 de centimètre cube de cette substance injectée aux chenilles de la mite des abeilles les tue au bout de 24 à 40 jours, et que les injections plus fortes et répétées agissent beaucoup plus rapidement.

Nous avons tenté de savoir s'il était possible d'immuniser les chenilles contre la toxine diphtérique.

Nos premiers essais ont été faits en immunisant des chenilles par faibles doses, non mortelles, de la toxine.

Nous avons injecté une seule fois 1/100 de centimètre cube de la toxine, diluée 20 fois avec l'eau physiologique, mais après cette injection les chenilles sont devenues, non plus résistantes, mais plus sensibles vis-à-vis de l'injection suivante de toxine, même à dose très faible.

Nous avons essayé aussi d'injecter la toxine en dose très faible, deux ou trois fois, et après l'injection la dose minime mortelle de la toxine, mais les chenilles ainsi traitées moururent plus vite que les chenilles normales.

Nous allons citer quelques-unes de nos expériences.

La toxine qui nous a servi pour ces expériences était la toxine diphtérique fraîchement préparée, et dont la dose mortelle pour le cobaye est d'environ 1/500 de centimètre cube.

C'est M. LOISEAUX qui nous a fourni la toxine au cours de nos recherches, et c'est un grand plaisir pour nous de le remercier de son amabilité.

Expérience faite le 26 septembre 1928. — 20 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube de la toxine diluée 20 fois.

Le 2 octobre, les chenilles immunisées et 20 chenilles normales ont reçu 1/200 de centimètre cube de la toxine non diluée.

Le 12 octobre, les chenilles prétendues immunisées étaient plus malades que les chenilles témoins.

Le 22 octobre, 13 des chenilles prétendues immunisées étaient mortes, et les autres étaient mourantes. Parmi les chenilles témoins, 2 sont mortes.

Le 27 octobre, toutes les chenilles prétendues immunisées sont mortes. Parmi les chenilles témoins : 6 sont mortes, 12 étaient malades.

Expérience faite le 31 octobre 1928. — 20 jeunes chenilles de *Galleria*

ont reçu 1/400 de centimètre cube de toxine diphtérique diluée 20 fois.

Le 3 novembre, toutes les chenilles étaient bien portantes et ont reçu 1/200 de centimètre cube de toxine diphtérique, diluée 20 fois.

Le 9 novembre, 2 chenilles sont mortes d'une infection microbienne. 28 chenilles immunisées, ainsi que le même nombre de chenilles témoins ont reçu une dose mortelle de toxine (1/100 de centimètre cube de toxine diluée au quart).

Le 20 novembre, 9 des chenilles dites immunisées sont mortes, et les autres étaient gravement malades; les chenilles témoins sont toutes restées vivantes.

Le 30 novembre, toutes les chenilles dites immunisées sont mortes. Parmi les chenilles témoins: 11 sont mortes, les autres sont malades.

Le 10 décembre, toutes les chenilles témoins, excepté une, sont mortes.

Expérience faite le 10 novembre 1928. — 20 jeunes chenilles de *Galleria* ont reçu 1/400 de centimètre cube de toxine diphtérique, diluée 20 fois.

Le 12 novembre, toutes les chenilles ont reçu à nouveau la même dose de toxine.

Le 15 novembre, j'ai de nouveau injecté toutes les chenilles avec la même dose de toxine.

Le 20 novembre, 20 chenilles immunisées, ainsi que 20 chenilles témoins, ont reçu la dose mortelle de toxine (1/100 de centimètre cube de toxine, diluée au tiers).

Le 30 novembre, 7 des chenilles dites immunisées sont mortes; les autres étaient malades. Les chenilles témoins sont toutes restées vivantes.

Le 10 décembre, toutes les chenilles dites immunisées sont mortes. Parmi les chenilles témoins: 11 sont mortes et 9 étaient malades.

Cette sensibilité que les chenilles acquièrent après la première injection d'une faible dose de toxine se conserve très longtemps, on peut même dire pendant toute la vie de la chenille.

L'anatoxine de RAMON, employée comme vaccin, nous a donné des résultats beaucoup plus intéressants.

Il est à remarquer que l'anatoxine est complètement inoffensive pour les chenilles.

Expérience faite le 2 décembre 1928. — 30 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/50 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 22 décembre, nous avons eu 23 papillons tout à fait normaux.

Le 29 décembre, nous avons eu 7 papillons normaux.

Expérience faite le 13 décembre 1928. — 30 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/50 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 15 décembre, toutes les chenilles étaient bien portantes et toutes ont reçu encore 1/50 de centimètre cube d'anatoxine.

Le 17 décembre, toutes les chenilles ont reçu encore 1/100 de centimètre cube d'anatoxine.

Le lendemain, une des chenilles est morte d'une infection microbienne;

les autres étaient bien portantes et ne présentaient aucun signe de la maladie les jours suivants.

Le 30 décembre, nous en avons eu 3 papillons normaux.

Le 6 janvier, nous en avons eu encore 22 papillons.

Le 9 janvier, nous avons reçu quatre derniers papillons.

D'après ces expériences, nous constatons que les chenilles peuvent supporter sans aucun dommage de fortes doses d'anatoxine diphtérique. 1/20 de centimètre cube inoculé en l'espace de 4 jours n'interrompt pas l'évolution normale de l'insecte.

Maintenant il resterait à savoir si les injections répétées d'anatoxine rendent les chenilles plus résistantes envers la toxine diphtérique?

Nous avons pris les chenilles jeunes et nous les avons inoculées avec l'anatoxine diphtérique. Tous les 2 jours, pendant 6 ou 9 jours, à partir de un ou plusieurs jours après la dernière injection, nous avons inoculé les chenilles avec la dose mortelle de toxine.

Expérience faite le 22 janvier 1929. — 23 jeunes chenilles ont reçu 1/100 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique; deux jours après, elles ont reçu la même dose d'anatoxine. 2 chenilles sont mortes d'une infection microbienne quelques jours après.

Le 31 janvier, les 23 chenilles vaccinées, ainsi que les 25 chenilles normales-témoins, ont reçu 1/50 de centimètre cube de toxine.

Le 7 mars, nous avons trouvé, parmi les chenilles immunisées : 6 papillons, 7 chrysalides vivantes et 10 chenilles mortes. Parmi les chenilles témoins : une seule s'est transformée en chrysalide; les 24 autres sont mortes.

Expérience faite le 1^{er} février 1929. — 20 jeunes chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique; 2 jours après, elles ont reçu la même dose d'anatoxine.

Le 5 février, les chenilles ont reçu à nouveau la même dose d'anatoxine. Une chenille est morte d'une infection microbienne.

Le 12 février, toutes les chenilles immunisées, ainsi que les 20 chenilles témoins ont reçu 1/100 de centimètre cube de toxine.

Le 9 mars, nous avons trouvé parmi les chenilles immunisées : 2 papillons, 6 chrysalides vivantes et 12 chenilles mortes. Parmi les chenilles témoins : 11 chenilles étaient mortes et 9 très malades.

Le 20 février, nous avons eu 6 nouveaux papillons provenant des chenilles immunisées, tandis que toutes les chenilles témoins étaient mortes.

Expérience faite le 26 janvier 1929. — 30 jeunes chenilles de *Galleria* ont reçu 1/200 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique; 2 jours après, elles ont reçu encore la même dose d'anatoxine. Le 4 février, les chenilles

ont reçu la troisième et dernière injection d'anatoxine à la dose de 1/100 de centimètre cube.

Le 11 février, les chenilles immunisées ainsi que 30 chenilles témoins, ont reçu l'injection de toxine diphtérique à la dose de 1/100 de centimètre cube.

Le 20 mars, nous avons trouvé parmi les chenilles immunisées : 6 papillons et 5 chrysalides vivantes. Toutes les chenilles témoins sont mortes, ainsi que 19 chenilles immunisées.

D'après ces expériences, on voit que les chenilles de *Galleria* sont aptes à s'immuniser contre la toxine diphtérique par les injections répétées d'anatoxine diphtérique.

Nos expériences nous ont montré que les chenilles s'immunisent plus facilement à la température du laboratoire qu'à une température plus élevée (30 et 37°), et toutes nos expériences citées ici ont été faites à ce degré de température (19 à 21°).

Comme nous le voyons par les chiffres des expériences citées ci-dessus, il n'y a que 30 ou 50 0/0 de chenilles qui acquièrent une résistance contre la toxine. La plupart des chenilles immunisées (50 et 70 0/0) meurent après l'inoculation de la dose mortelle de toxine.

Dans certaines de nos expériences, nous avons eu une mortalité de chenilles immunisées encore plus élevée, parfois 80 et même 90 0/0, mais ordinairement, la mortalité des chenilles varie aux environs de 60 0/0. Cette immunité est d'ailleurs assez faible, et il est assez rare que les chenilles vaccinées puissent supporter l'injection d'une dose de toxine 10 ou 20 fois plus forte que la dose minima mortelle.

Pour démontrer l'immunité acquise envers la toxine, il est préférable d'injecter aux chenilles vaccinées une dose minima mortelle, ou deux ou trois fois plus forte que la dose minima mortelle.

Ordinairement, les papillons qui sortent des chenilles vaccinées et inoculées ensuite avec la toxine sont très défectueux.

La défense contre la toxine est très imparfaite chez les chenilles, et malgré qu'elles survivent à l'injection de toxine, elles ne peuvent pas la neutraliser tout à fait avant qu'elle soit fixée par les cellules sensibles à son action.

Il en est de même pour les papillons qui sortent des chenilles non vaccinées inoculées avec une faible dose non mortelle de toxine.

3° *Rapidité d'établissement et durée de l'immunité acquise.*

— MÉTALNICOV a démontré que contre les microbes, l'immunité se forme très vite : de 2 à 7 heures après l'injection du vaccin, les insectes peuvent supporter déjà les injections des doses mortelles des microbes.

Le mécanisme de l'immunité contre les poisons solubles diffère beaucoup de celui de l'immunité contre les microbes, et nous avons cru intéressant d'étudier cette question de plus près.

Expérience faite le 9 mars 1929. — 30 Chenilles ont reçu l'injection de 1/100 de centimètre cube de l'anatoxine diphtérique.

Le 11 mars, elles ont reçu la deuxième injection d'anatoxine à 1/100 de centimètre cube.

Le lendemain, 10 des chenilles immunisées, ainsi que 10 chenilles normales, ont reçu 1/500 de centimètre cube de toxine diphtérique.

Toutes ces chenilles sont mortes en 36 jours.

Le 14 mars, 10 des chenilles vaccinées, ainsi que les chenilles témoins, ont reçu 1/500 de centimètre cube de toxine diphtérique.

3 des chenilles vaccinées ont survécu à l'injection de toxine, tandis que les chenilles témoins sont toutes mortes.

Le 16 mars, 10 des chenilles vaccinées et 10 chenilles témoins, ont reçu 1/500 de centimètre cube de toxine.

Le 26 avril, nous avons trouvé parmi les chenilles vaccinées : 4 papillons et une seulement des chenilles témoins a survécu à cette injection.

De cette expérience et d'autres analogues, il ressort que l'immunité contre la toxine diphtérique s'établit au bout de 5 ou 6 jours, depuis le commencement de la vaccination, et qu'elle dure plusieurs jours : au moins toute la vie de la chenille.

4° *Immunité passive.* — Comme nous l'avons déjà dit, l'immunité passive contre les microbes, chez les insectes, a été établie par ZERNOFF, HOLLANDE, AGHAR et VICHER, mais l'immunité passive peut-elle être créée chez les insectes contre les toxines?

Nous savons que chez les animaux supérieurs, l'immunité passive contre les poisons bactériens solubles, présente un des plus beaux exemples de ce genre d'immunité.

Pour résoudre cette question, nous avons fait les expériences suivantes.

Nous avons commencé par laver les chenilles dans une solution d'eau phéniquée à 3 0/0 pendant 5 minutes, et après nous

les avons transportées dans l'éther pendant une minute environ.

Après nous avons pris le sang des chenilles en coupant une des pattes thoraciques. Le sang a été recueilli stérilement dans les pipettes de PASTEUR stériles pour être le plus vite possible injecté aux chenilles, car comme nous l'avons déjà dit, le sang des insectes s'oxyde et devient très vite toxique à l'air. Chaque chenille nouvelle a reçu $1/100$ ou $2/100$ de centimètre cube de sang des chenilles vaccinées. Après l'injection du sang, nous avons injecté ces chenilles avec la toxine au bout de différents laps de temps, de 1 à 48 heures.

Expérience faite le 9 mars 1929. — 20 Chenilles ont reçu $1/100$ de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 20 mars, on a pris stérilement le sang des chenilles vaccinées, et on l'a injecté à la dose de $1/50$ de centimètre cube aux 30 chenilles normales.

Le 24 mars, les chenilles qui avaient reçu le sang des chenilles vaccinées, ainsi que 30 chenilles normales, ont reçu $1/200$ de centimètre cube de la toxine diphtérique.

Le 26 avril, nous avons trouvé parmi les chenilles vaccinées : 16 papillons et 14 chenilles mortes. Parmi les chenilles témoins : 1 seul papillon très défectueux et 29 chenilles mortes.

Expérience faite le 19 février 1929. — 10 Chenilles ont reçu $1/100$ de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 20 février, elles ont reçu encore $1/100$ de centimètre cube d'anatoxine ; le 22, les 10 chenilles ont reçu la troisième injection d'anatoxine à la dose de $1/200$ de centimètre cube.

Le 25 février, nous avons pris stérilement le sang des chenilles vaccinées, et nous l'avons injecté aux 15 chenilles normales à la dose de $1/100$ de centimètre cube.

Deux heures après l'injection du sang, nous avons injecté ces chenilles avec $1/100$ de centimètre cube de la toxine diphtérique ; 15 chenilles témoins ont reçu la même injection.

Le 6 avril, nous avons trouvé parmi les chenilles ayant reçu le sang des chenilles vaccinées : 5 papillons, 2 pupes et 8 chenilles mortes. Les chenilles témoins étaient toutes mortes.

Expérience faite le 3 mars 1929. — 20 Chenilles ont reçu $1/100$ de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 5 mars, elles ont reçu la deuxième et la dernière injection d'anatoxine.

Le 10 mars, nous avons pris stérilement le sang des chenilles immunisées, et nous l'avons injecté aux 25 chenilles nouvelles, à la dose de $1/100$ de centimètre cube.

48 heures après, les chenilles ainsi vaccinées et 25 chenilles normales ont reçu $1/300$ de centimètre cube de toxine diphtérique.

Le 19 avril, nous avons constaté 40 papillons provenant des chenilles vaccinées ; toutes les autres chenilles étaient mortes.

De ces expériences, il ressort clairement que l'immunité passive contre une toxine peut être créée par l'injection de sang des chenilles préalablement vaccinées contre cette même toxine.

Il est curieux de constater que souvent les chenilles à immunité passive survivent mieux à l'injection de toxine que les chenilles immunisées directement avec l'anatoxine diphtérique.

5° *Mécanisme de l'immunité contre la toxine diphtérique chez les Chenilles de Galleria Mellonella.* — Nous avons vu que les chenilles de *Galleria* peuvent s'immuniser contre la toxine diphtérique, et que le sang des chenilles vaccinées est doué d'une propriété immunisante : C'est donc dans le sang, dans les cellules ou dans le plasma que cette nouvelle propriété apparaît, lors de l'immunisation.

Quelles sont ces substances qui assurent l'immunité chez les chenilles ?

Chez les animaux supérieurs, ce sont les antitoxines qui sont produites par l'organisme pour se défendre contre les poisons bactériens solubles, et qui alors neutralisent les toxines.

Nous avons cru intéressant d'étudier si les antitoxines diphtériques peuvent préserver les chenilles contre l'action de la toxine.

L'antitoxine diphtérique est tout à fait inoffensive pour les chenilles de la mite des abeilles. Elles peuvent supporter l'injection de doses énormes d'antitoxine.

L'administration d'antitoxine quelques heures, un ou quelques jours avant l'injection d'une dose mortelle de toxine, préserve très bien contre la toxine diphtérique, comme nous le voyons par l'expérience ci-dessous.

Expérience faite le 12 janvier 1929. — 40 Chenilles ont reçu $\frac{1}{50}$ d'antitoxine diphtérique (300 unités antitoxiques par 1 centimètre cube).

Le 13 janvier, 40 chenilles vaccinées et 40 chenilles témoins ont reçu $\frac{1}{50}$ de la toxine.

Le 20 février, nous avons eu 40 papillons provenant des chenilles immunisées, et toutes les chenilles témoins étaient mortes.

Dans toutes nos expériences faites sur l'immunisation des

chenilles avec l'antitoxine, les papillons qui sortaient des chenilles ainsi vaccinées et injectées ensuite avec une forte dose de toxine (10 ou 20 fois plus forte que la dose minima mortelle) était toujours tout à fait normaux.

Donc le sérum des animaux supérieurs vaccinés contre la toxine diphtérique neutralise complètement l'action du poison des bactéries diphtériques sur les insectes.

Il est donc à supposer que le mécanisme de l'action de la toxine sur les chenilles ne diffère guère, en principe, de celui de l'action sur les animaux supérieurs.

Le sérum antitoxique peut avoir aussi une action curative.

Expérience faite le 3 février 1929. — 30 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube de la toxine diphtérique.

6 heures après, 15 de ces chenilles ont reçu 1/30 de centimètre cube d'antitoxine diphtérique (300 unités antitoxiques par 1 centimètre cube).

Le 16 avril, les chenilles qui avaient reçu la toxine et le sérum antitoxique se sont toutes transformées en papillons. Les chenilles témoins sont toutes mortes.

Mais l'action curative du sérum antitoxique est d'autant plus efficace que l'intervalle entre les injections des toxines et de l'antitoxine est plus courte. L'antitoxine reste déjà sans action, quand on l'injecte 3 ou 4 jours après l'injection de la toxine, bien que les premiers signes de la maladie, après l'administration de la toxine, n'apparaissent guère avant 5 ou 6 jours. Sans doute, au bout de 3 jours la toxine est déjà fixée par les cellules sensibles, mais elle ne les a pas encore altérées.

Le sang des chenilles vaccinées avec l'anatoxine est-il doué d'une propriété antitoxique ?

Nous avons fait une série d'expériences *in vitro*.

Nous avons mélangé le sang des chenilles vaccinées et le sang des chenilles normales avec la toxine diphtérique.

Nous avons mis les mélanges pendant deux heures à l'étuve à 37°, et pendant 22 heures à la glacière, et après, nous les avons injectés aux chenilles normales.

Nous allons citer une de nos expériences faite le 3 mars 1929.

15 Chenilles de *Galleria* ont reçu 1/100 de centimètre cube d'anatoxine diphtérique.

Le 5 mars, elles ont reçu la deuxième injection.

Le 11 mars, nous avons pris le sang des chenilles vaccinées et des 15 chenilles normales.

Nous avons mélangé le sang avec la toxine dans les proportions suivantes : une partie de toxine et 3 parties de sang.

Nous avons recouvert les mélanges avec une couche d'huile de paraffine pour éviter l'oxydation du sang, et nous avons mis les mélanges, d'abord à l'étuve, puis à la glacière, comme nous l'avons indiqué plus haut.

Le lendemain, nous avons injecté 10 chenilles avec le mélange de toxine et de sang des chenilles vaccinées, et 10 autres avec le mélange de toxine et de sang des chenilles normales, chaque chenille avec 1/100 de centimètre cube du mélange (c'est-à-dire avec 1/300 de centimètre cube de toxine).

6 jours plus tard, les chenilles qui avaient reçu le mélange de toxine, plus le sang des chenilles normales, sont toutes mortes.

Les chenilles qui avaient reçu le mélange de toxine et du sang des chenilles vaccinées, ont toutes été un peu malades.

Le 12 avril, nous avons eu 7 papillons légèrement défectueux provenant des chenilles ayant reçu le mélange avec le sang des chenilles vaccinées : 1 puce et 2 chenilles mortes.

De ces expériences, il ressort que le sang des chenilles vaccinées avec l'anatoxine est doué incontestablement d'une propriété neutralisante de toxine.

Le mélange de toxine et de sang provenant des chenilles normales devient très toxique, car dans nos expériences, les chenilles qui avaient reçu un tel mélange, moururent au bout de 5 ou 6 jours, beaucoup plus rapidement que les chenilles ayant reçu la même dose de toxine pure.

De tous les faits exposés jusqu'à présent, il ressort que lors de l'inoculation de toxine diphtérique dans le sang des chenilles de *Galleria*, une substance neutralisante de la toxine diphtérique apparaît. Mais quelle est cette substance ? devons-nous la comparer avec l'antitoxine des animaux supérieurs ?

Si elle peut préserver les animaux supérieurs contre la toxine diphtérique, elle est alors de la même nature que le sérum antitoxique de ces animaux.

Nous avons fait l'expérience suivante.

Expérience faite le 12 mars 1929. — Un cobaye (n° 6, 420 grammes) a reçu environ 1 centimètre cube de sang des chenilles vaccinées par trois injections successives d'anatoxine diphtérique (la dernière injection a été pratiquée 11 jours avant le prélèvement du sang).

Le cobaye (n° 7, 435 grammes) a reçu la même quantité de sang provenant de chenilles normales.

24 heures après, les 2 cobayes ont reçu 1/50 de centimètre cube de toxine diphtérique stabilisée, dont la dose mortelle est environ de 1/100 de centimètre cube.

Le cobaye n° 7 est mort 60 heures plus tard ; le cobaye n° 6 resta vivant pendant 41 jours.

Ce résultat est assez démonstratif, étant donné surtout, comme nous l'avons déjà indiqué, que seulement 30 à 50 0/0 des chenilles acquièrent une immunité, et d'ailleurs assez faible.

Comment peut-on expliquer l'insuccès de METCHNICOV dans ses expériences sur l'immunisation des larves d'*Oryctes* ?

La toxine tétanique est complètement inoffensive pour cet insecte, et comme METCHNIKOFF l'a démontré, elle reste dans le sang de la larve intacte pendant quelques semaines sans déclancher une réaction quelconque de l'organisme.

Le même cas se produit pour les larves de *Lucilia cæsar* et de *Chrysomya macellaria*, où le poison botulique reste non neutralisé pendant toute la vie de l'insecte, comme un corps étranger tout à fait indifférent dans le sang. Les chenilles de *Galleria*, au contraire, présentent une sensibilité relativement élevée vis-à-vis de la toxine diphtérique, qui, étant injectée dans le corps de l'insecte, produit des réactions violentes de défense.

Des faits exposés dans ce chapitre, il ressort que les chenilles de *Galleria* peuvent produire une sorte d'antitoxine, mais d'une façon faible et irrégulière comparativement aux animaux supérieurs. C'est, pourrait-on dire, l'ébauche de cette propriété remarquable que possèdent les animaux à sang chaud, d'une façon plus constante et plus développée.

Il faut se rendre compte que la technique que nous avons utilisée au cours de nos recherches est celle utilisée normalement pour les animaux supérieurs, et il est possible qu'avec une méthode plus appropriée, on obtiendrait des résultats meilleurs que les nôtres.

CONCLUSIONS

Nous avons passé en revue les faits principaux sur l'immunité chez les insectes, et nous allons donner maintenant les conclusions que nous avons tiré de l'exposé précédent.

1° Les insectes sont doués d'une immunité naturelle remarquable vis-à-vis de la plupart des microbes, très pathogènes, pour les animaux supérieurs.

2° Il existe une quantité de microbes inoffensifs pour les animaux supérieurs, mais extrêmement pathogènes pour les insectes ; il est à croire que ce sont les microbes qui sont le plus adaptés pour vivre dans l'humeur des insectes.

3° Chez ces microbes il existe une spécificité (dont la limite peut varier largement suivant l'espèce) qui leur permet de provoquer une maladie mortelle chez une espèce déterminée d'insectes, mais qui ne trouve pas de terrain convenable pour leur développement chez les espèces voisines.

4° Ordinairement les différentes souches d'un microbe sont douées de virulence inégale vis-à-vis d'une seule espèce d'insectes ; cette différence de virulence varie dans des limites très larges, beaucoup plus larges que pour les animaux supérieurs. Il existe très peu de microbes dont toutes les souches soient pathogènes ou inoffensives pour un insecte donné.

5° Le facteur microbe est très important. Souvent les repiquages des microbes sur les milieux artificiels atténuent très vite leur virulence. Nos recherches personnelles ont démontré que la composition et l'acidité du milieu ont une influence considérable sur la virulence. L'acidité optimale pour le *Coccobacillus ellingeri* Mét. et Chor. et pour le *Bacterium galleriæ* n° 2, Mét. et Chor., correspond à un $pH = 7,2$. Les passages successifs des microbes par les insectes est un bon moyen pour conserver la virulence fragile des microbes.

6° Les insectes se contaminent difficilement par la voie buc-

cale en général, mais il existe néanmoins des espèces très sensibles à l'infection *per os*.

7°. Tous les microbes qui sont pathogènes pour les insectes contiennent des endotoxines qui les empoisonnent, et ce fait explique en partie l'action pathogène des microbes sur les insectes.

8° Les insectes en général sont beaucoup plus résistants vis-à-vis des toxines bactériennes solubles connues jusqu'à présent, que les animaux à sang chaud.

9° Des expériences que nous avons fait il ressort que les chenilles de *Pyrausta* sont insensibles à l'injection de la toxine tétanique, mais l'injection de la toxine diphtérique, à dose de 0,01 centimètre cube, les tue en un ou deux mois.

10° Les Chenilles de *Galleria* sont insensibles vis-à-vis de l'injection, même à une dose considérable, de la toxine tétanique et des filtrats des microbes les plus pathogènes pour elles.

11° Mais elles sont assez sensibles à l'administration de la toxine diphtérique, qui les tue à une dose de 0,002 centimètre cube.

12° Ordinairement les insectes s'immunisent facilement contre la dose mortelle des divers microbes.

13° On peut immuniser les insectes :

a) Par l'injection des cultures tuées ou affaiblies par le chauffage.

b) Par l'injection de doses minimes des cultures jeunes virulentes.

c) Par l'injection des cultures vieilles d'un microbe virulent.

d) Par l'injection du bactériophage correspondant.

e) Par l'injection des cultures asporogènes affaiblies d'un microbe, extrêmement pathogène.

14° De nos expériences il ressort qu'il existe une concentration optima du vaccin qui assure le mieux l'immunité.

15° L'immunisation des insectes par la voie buccale n'entraîne pas une immunité générale : ce sont les cellules de l'intestin seules qui acquièrent une résistance, d'ailleurs assez faible.

16° L'immunité acquise a été étudiée chez un petit nombre d'espèces d'insectes, et contre les microbes peu nombreux.

Elle a été plus étudiée chez les chenilles de *Galleria mellonella*.

17° L'immunité acquise s'établit avec une rapidité surprenante ; généralement 2 à 7 heures après l'injection du vaccin, les chenilles peuvent supporter l'injection des doses mortelles de microbes.

18° Contre certains microbes, l'immunité acquise dure à peine 36 heures ; pour les autres, elle persiste plus longtemps, et contre les troisièmes, elle se transmet de la chenille à la pupe et au papillon.

19° L'immunité acquise contre certains microbes peut être héréditaire, comme MÉTALNICOV l'a démontré pour le microbe de Danysz.

20° L'immunité acquise chez les insectes n'est pas strictement spécifique, comme nous l'avons démontré.

21° La troisième paire des ganglions thoraciques a une très grande influence sur la formation de l'immunité acquise. Si ces ganglions sont détruits, il est impossible, d'après MÉTALNICOV, d'immuniser les chenilles ; les autres ganglions nerveux n'ont pas une action appréciable sur la production de l'immunité acquise.

22° Des expériences que nous avons fait il apparaît aussi que les chenilles, décapitées ou privées des deux premiers segments antérieurs, s'immunisent aussi bien que les chenilles normales, tandis que les chenilles privées de plus de deux segments antérieurs, ou celles privées d'un ou de plusieurs segments postérieurs s'immunisent mal.

23° L'injection des anticorps élaborés par les animaux supérieurs confère aux chenilles une immunité passive.

24° L'injection aux chenilles neuves du sang des chenilles, préalablement vaccinées, leur confère une immunité passive.

25° L'injection du plasma seul ou des leucocytes lavés confère aussi bien l'immunité passive aux chenilles que le sang tout entier.

26° L'injection du sang des chenilles, préalablement vaccinées, peut avoir aussi une action curative, si l'intervalle entre l'injection du microbe et du sang n'est pas très long, c'est-à-dire si les microbes pathogènes n'ont pas eu le temps de produire de lésions graves et irréparables.

27° L'injection du sang de chenilles normales augmente la

résistance des chenilles, mais à un degré beaucoup plus faible que l'injection du sang des chenilles vaccinées.

28° L'immunité passive n'est pas strictement spécifique.

29° Nos recherches ont démontré que les chenilles de *Galleria* sont très sensibles vis-à-vis de la toxine diphtérique, et il est impossible de les immuniser contre ce poison par l'injection de faibles doses de toxine.

30° L'anatoxine diphtérique, injectée 2 ou 3 fois, immunise les chenilles de *Galleria* contre la dose mortelle de toxine, mais cette résistance est assez faible.

31° Cette immunité commence à se manifester au bout de 5 ou 6 jours après le début de la vaccination, et dure toute la vie de la chenille.

32° Le sang des chenilles vaccinées avec l'antitoxine, injecté aux chenilles normales, leur confère une immunité marquée.

33° Le sérum antitoxique peut avoir une action curative, quand l'intervalle entre l'injection de toxine et d'antitoxine, ne dépasse pas 3 jours.

34° Le sang de chenilles vaccinées par l'anatoxine, peut être comparé au sérum antitoxique des animaux supérieurs; tous les deux neutralisent la toxine *in vitro*, et peuvent préserver les animaux sensibles contre la toxine.

35° Nous pouvons donc dire que l'immunité active contre la toxine diphtérique chez les chenilles est due à l'élaboration d'une substance neutralisante, la toxine, analogue à l'antitoxine des animaux supérieurs.

36° Comme on le sait, il existe actuellement deux théories principales de l'immunité contre les microbes. La première, qui a été développée par METCHNIKOFF, a démontré l'importance des leucocytes dans la lutte contre les microbes ayant pénétré dans l'organisme. Les cellules, qu'il a désignées sous le nom de phagocytes, englobent les microbes et les digèrent à l'intérieur de leur protoplasme.

Il a expliqué le mécanisme de l'immunité par l'activité des phagocytes : c'est la théorie de l'immunité cellulaire. Des observations innombrables, faites depuis par plusieurs savants, en ont apporté une preuve décisive.

L'autre théorie — théorie humorale de l'immunité qui a été

développée par EHRLICH — tend à démontrer le rôle principal de l'humour dans l'immunité.

D'après cette théorie, ce sont surtout les divers anticorps qui participent à la lutte contre les microbes.

Ces deux théories ont été appliquées pour expliquer l'immunité chez les insectes. La deuxième a été soutenue par PAILLOT, qui prétend que ce sont surtout les bactériolysines, et d'autres anticorps (dont on n'a pas encore pu relever l'existence) qui détruisent les microbes à l'intérieur de l'organisme.

La théorie de METCHNIKOFF a été appliquée par MÉTALNICOV pour expliquer l'immunité antimicrobienne chez les insectes. MÉTALNICOV, dans une longue série de travaux, très intéressants, a mis brillamment en évidence toute l'importance des phagocytes et de la phagocytose chez les Invertébrés.

Par des expériences très nombreuses et très démonstratives, dont nous avons cité quelques-unes, il a apporté la preuve indiscutable que l'immunité des insectes est une immunité essentiellement cellulaire.

Les élèves de M. MÉTALNICOV ont apporté des preuves nouvelles en faveur de sa théorie — de la théorie cellulaire de l'immunité des insectes.

L'existence des anticorps dans le sang des insectes ne contredit pas cette théorie. Jusqu'à présent, l'existence des bactériolysines n'a été démontrée que contre un petit nombre de microbes.

La plupart des microbes injectés ne peuvent être dissous par le plasma du sang, mais par contre sont phagocytés et digérés par les leucocytes.

Par ce fait, s'explique l'immunité naturelle contre les microbes.

Chez les insectes immunisés, on a constaté une accélération de l'intensité de la phagocytose. La phagocytose commence plus rapidement que chez les insectes normaux, et elle est plus intense, les microbes n'ayant pas eu le temps de commencer leur multiplication. Il s'en suit que les leucocytes peuvent détruire un nombre de microbes plus grand que celui des insectes non immunisés, et plus rapidement.

D'autre part, les bactériolysines, quand elles existent, sont

aussi plus précoces et plus intenses que chez les insectes non immunisés.

En définitive, il ressort de nos expériences que l'immunité acquise chez les insectes résulte principalement de la précocité de la phagocytose et de l'augmentation de son intensité. Cette immunité peut être renforcée par la précocité de la réaction humorale, quand elle existe.

Nos recherches personnelles ont démontré la possibilité d'une immunisation antitoxique active chez les chenilles de la mite des abeilles. Cette immunisation tient à l'apparition dans le sang des chenilles, lors de l'immunisation, de substances nouvelles neutralisant la toxine. Ce fait est comparable à la production d'antitoxine chez les animaux supérieurs.

BIBLIOGRAPHIE

- AGHAR (M.). — Contribution à l'étude de l'Immunité chez les Insectes (Thèse de la Faculté de Pharmacie de Montpellier. Emmanuel Montane, éditeur. Montpellier, 1928).
- AOKI (K.) und CHIGASAKI (I.). — Über das Toxin von sog Sotto Bacillen (*Mitteil der med. Fakult. der Kaizer Univer. Tokyo* Bd. XIV, hift 1, 1915).
- AOKI (K.) und CHIGASAKI (I.). — Über die Pathogenität der sog Sotto bacillen (Ischiwata) dei Seidenranpen (*Bull. Imp. Sericult. Exp. Station Japon*, v. I, f. 1, p. 97, 1916).
- BALBIANI. — Etudes bactériologiques sur les Arthropodes (*C. R. de l'Acad. des Sc.*, t. 103, p. 952, Paris, 1886).
- BENGSTON (I. A.). — Preliminary note on a toxine producing anaerobe isolated from the larvæ of *Lucilia cæcar* (*Pub. Health Rep.*, 37, 164-170, 1922).
- Studies on organisms concerned as causative factors in botulism (*Hygienic Laboratory Bulletin*, 136, pp. 1-96, 1924).
- BERLINER (E.). — Über die Schlafsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuhniella* Zell.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. (*Zeitschrift für angewandte Entomologie*, Bd 2, 1915, pp. 29-56).
- BESREDKA (A.). — L'immunité dans les maladies infectieuses (Masson et Cie, éditeurs. Paris, 1926).
- BISHOP (F. C.). — Limberneck of fowls produced by fly larvæ (*Journ. Parasit.*, 9, 170-173, 1923).
- BORDET (L.). — Traité de l'Immunité dans les maladies infectieuses (Masson et Cie, éditeurs. Paris, 1920).
- BOURNE. — *Proceedings of the Royal Society*, 1887, t. 42, p. 17.
- CANTACUZÈNE (J.). — Le problème de l'immunité chez les Invertébrés (75^e anniversaire de la Soc. de Biol., p. 48-119, 1923).
- CHATTON (E.). — *Treponema drosophilæ* n. sp. Agglutination par le suc des cellules intestinales de l'hôte et cytolysé (*C. R. de la Soc. de Biol.*, 73, p. 212-215, 1912).
- CHATTON (E.). — Recherches sur l'action pathogène de divers coccobacilles sur le hanneton, le ver à soie, la cochylys et l'eudénis (*Annales du serv. des Epiphyties*, 1913, t. 1, p. 379-391).
- CHIGASAKI (J.). — Sur l'immunisation de *Galleria* aux différents stades de sa vie (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, t. 93, p. 573).
- CHORINE (V.). — Microbes provoquant une maladie mortelle chez les chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, Paris, 1926, t. 95, p. 199).
- Microbes pathogènes de *Galleria mellonella* (*Ann. Inst. Pasteur*, Paris, 1925, t. 41, p. 1114-1126).
- Sur l'immunisation des chenilles de la mite des abeilles (*Galleria mellonella*) (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 97, p. 1288-1291).

- Sur la spécificité de l'immunité acquise chez les Insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 97, p. 1395-1397).
- Sur l'immunité des chenilles de *Galleria mellonella* contre le *Bacterium galleriæ* n° 2 (*C. R. Ac. Sc.*, 1928, t. 186, p. 1656-1659).
- Influence de la concentration en ions H⁺ du milieu de culture sur la virulence du Coccobacille de la Pyrale du Maïs (*C. R. Acad. Sci.*, 1928, t. 186, p. 657).
- et KORVINE KROUKOWSKY (M.). — Sur l'immunisation de fragments isolés du corps des chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1929, t. 100, p. 15-16).
- Sur une Microsporidie nouvelle (*Thelohania vanessæ*), parasite des chenilles de *Vanessa urticæ* L. (*Zentralblatt f. Bacteriol. Parasitenkunde u. Infektionskrankheiten (Originale)*, B. 117, p. 86 89, 1930).
- CONTE et VANEY. — Production expérimentale de Lépidoptères acéphales (*C. R. Acad. Sci.*, t. 152, p. 404, 1914).
- CUÉNOT (L.). — Etude sur les glandes lymphatiques et le sang chez les invertébrés et les vertébrés (*Archives de zool. expér. et générale*, 2^e série, t. 10, p. 7-9, 1891).
- Etudes physiologiques sur les Orthoptères (*Arch. Biol.*, 14, p. 293-344, 1895, 2 pl.).
- Les globules sanguins et les organes lymphoïdes des Invertébrés (*Arch. anat. microsc.*, 1, 1897).
- DICKSON (E.). — Botulism a clinical and experimental study. *Rockefeller Inst. for Med. Res. (Monograph n° 8, New-York, 1918)*.
- ECKSTEIN (F.). — Ein Beitrag zur experimentellen Parasitologie der Insekten (*Zeitschrift für Parasitenkunde Abt. F.* 1930, t. 2, p. 571-582).
- FIESSINGER (N.). — L'immunisation de la mite des Abeilles (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 147-150).
- Les ferments des leucocytes (Masson, éditeur. Paris, 1923).
- GLASER (R. W.). — Existence of immunity principles in insects (*Psyche, Journ. of Entomology*, 1918, t. 25, p. 39-46, Boston).
- Acquired immunity in silkworms (*Journal of Immunology*, t. 10, f. 4, p. 651-662).
- HÉRELLE (F. d'). — Sur une épizootie de nature bactérienne sévissant sur les sauterelles au Mexique (*C. R. Acad. Sci.*, 1911, t. 152, p. 1413).
- Les coccobacilles des sauterelles (*Ann. Inst. Pasteur*, 1914, t. 28, p. 280 et p. 387).
- Sur le procédé biologique de destruction des sauterelles (*C. R. Acad. Sci.*, 1915, t. 161, p. 503-505).
- La campagne contre les sauterelles en Tunisie en 1915 (*Bull. Soc. Path. Exot.*, 1915, t. 8, p. 629-633).
- Campagne contre les *Schistocerca peregrina* en Tunisie (*Arch. de l'Inst. Pasteur de Tunis*, 1916, t. 9, f. 3).
- HOLLANDE (A. Ch.). — Contribution à l'étude du sang des Coléoptères (*Arch. Zoologie Expér.*, 1909, t. 2, f. 5, 5^e série, p. 271).
- Etude histologique comparée du sang des insectes à hémorrhée et des insectes sans hémorrhée (*Arch. Zool. expér.*, t. 4, f. 9, 5^e série, p. 283, 1911).
- HOLLANDE (A. Ch.). — Absence d'alexine dans le sang des insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1919, t. 82).
- Oénocytoides et Tératocytes (*C. R. Acad. Sci.*, 1920, t. 170).
- Remarques au sujet de la transformation en masse brunâtre du B. T. à

- l'intérieur des phagocytes du sang des chenilles (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83).
- La formation du pigment brun noir (mélanine) au cours de la phagocytose chez les insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83).
 - et AGHAR (M.). — La phagocytose et la digestion des bacilles tuberculeux par les leucocytes du sang de chenilles autres que *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. 99, f. 20, p. 120-123).
 - et VICHER (M.). — Vaccination des Insectes par le virus vivant sensibilisé (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. 99, 1471-1473).
 - et GÉLY (Mlle M.). — La formation des nodules leucocytaires tuberculeux chez les insectes (*C. R. Soc. Biol.*, t. 102, p. 384, 1929).
- ISCHIMORI. — Sur l'immunisation des chenilles (*C. R. Soc. Biol.*, 1924, t. 90, p. 843).
- IWASAKI (J.). — Sur le déclenchement expérimental des ondes de cinèse dans le sang de quelques insectes (*Ann. de Physiol.*, déc. 1925, p. 580).
- KOPEC (S.). — Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphoses (*Biological Bull.*, Marine Biol. Lab., Woods Hole, 1922, t. 42, p. 323-342).
- KOVALEWSKY (A.). — Etude expérimentale sur les glandes lymphatiques des invertébrés (*Mél. biol. Acad. Sci. St-Petersbourg*, 1894, t. B, p. 458).
- MÉTALNIKOV (S.). — Tuberkulose bei Bienenmotte (*Zentralblatt f. Bacteriologie*, Bd. 40, Berlin 1906).
- Sur l'immunité de *Galleria mellonella* vis-à-vis des bacilles tuberculeux (*C. R. Soc. Biol.*, 1906, t. 60, p. 518).
 - Contribution à l'étude de l'immunité contre l'infection tuberculeuse. Immunité chez les mites des abeilles (*Arch. Soc. Biol. Russe*, 1907, t. 13, no 2, p. 300).
 - Recherches expérimentales sur les chenilles de *Galleria mellonella* (*Arch. Zool. Expér.*, VIII, IV^e série, p. 489-588, 1908).
 - Immunité des chenilles contre le bacille tuberculeux (*C. R. Soc. Biol.*, 1910, t. XII et XIII, p. 138).
 - De la tuberculose chez les insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1914, t. 77, p.).
 - Immunité naturelle et acquise chez les chenilles de *Galleria mellonella* (1^{er} Mémoire) (*Ann. Inst. Pasteur*, 1920, t. 34, p. 888).
 - Sur la digestion du B. T. dans le corps des chenilles de *Galleria mellonella*.
 - Immunité de la chenille contre divers microbes (*C. R. Soc. Biol.*, t. 83, p. 419).
 - Bacille dysentérique et bactériophage d'Hérelle chez *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83).
 - Immunité naturelle et acquise chez les chenilles de *Galleria mellonella* (2^e Mémoire) (*Ann. Inst. Pasteur*, 1921, t. 35, p. 363).
 - et GASCHEN. — Sur la rapidité d'immunisation chez les chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 85, p. 224).
 - et GASCHEN. — Immunité cellulaire et humorale chez la chenille (*Ann. Inst. Pasteur*, 1922, t. 36, p. 233).
 - Anaphylaxie et Immunité (*Ann. Inst. Pasteur*, 1922, t. 36, p. 632).
 - et EPHRUSSI. — Phagocytose et Virulence des microbes (*C. R. Soc. Biol.*, t. 86, p. 65-67, 1922).
 - Les changements des éléments du sang de la chenille pendant l'immunisation (*C. R. Soc. Biol.*, t. 86, p. 350, 1922).

- Influence du système nerveux sur l'immunité des chenilles (*C. R. Acad. Sci.*, 1923, t. 177, p. 671).
- et TOUMANOFF. — La lèpre chez les insectes (*C. R. Soc. de Biol.*, 1923, t. 89, p. 935).
- Rôle des anticorps dans l'immunité des chenilles (*Ann. Inst. Pasteur*, 1924, t. 37, p. 528).
- Phagocytose et réaction des cellules dans l'immunité (*Ann. Inst. Pasteur*, 1924, t. 38, p. 787).
- et ISCHIMORI. — Immunisation de la chenille de *Galleria mellonella* par des substances non spécifiques (*C. R. Acad. Sci.*, 1924, t. 178, p. 2436).
- Mme TOUMANOFF et Mlle KOSTRITZY. — Bacterium tumifaciens chez les chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Acad. Sci.*, t. 179, p. 222, 1924).
- Sur l'hérédité de l'immunité acquise (*C. R. Acad. Sci.*, 179, p. 514-516, 1924).
- L'immunité de *Galleria mellonella* contre la tuberculose pendant les stades larvaires et la métamorphose (*Ann. Inst. Pasteur*, 1925, t. 39, p. 629).
- Contribution à l'étude de l'immunité chez les invertébrés (*Ann. Inst. Pasteur*, 1926, t. 40, p. 787).
- L'infection microbienne et l'immunité chez la mite des abeilles *Galleria mellonella* (*Monographie Inst. Pasteur*, Masson édit., 1927).
- et CHORINE. — Rôle des réflexes conditionnels dans la formation des anticorps (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. 99, p. 142-144).
- et CHORINE. — Etude sur le rôle des réflexes conditionnels dans l'immunité (*Zeitschr. f. Immunitätsforschung*, 1928, Bd. 57, heft 3-4, p. 326-336).
- and CHORINE (V.). — On the infection of the Gypsy-moth and certain other insects with *Bacterium thuringiensis* (*International Corn Borer Investigations. Scient. Reports*, 2, p. 60 61, Chicago, 1929).
- et CHORINE (V.). — Etude sur l'immunité naturelle et acquise des *Pyrausta nubilalis* (*Ann. Inst. Pasteur*, 1930, t. 44, p. 273-278).
- et TOUMANOFF (K.). — Les cellules sanguines et la phagocytose chez les larves d'abeilles (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, t. 103, p. 965-967).
- METCHNIKOFF (E.). — L'immunité dans les maladies infectieuses (Masson, édit., Paris, 1901).
- MÜLLER (K.). — Über die korpuskularen Elemente der Blutflüssigkeit bei der erwachsenen Honigbiene (*Apis mellifica*) (Berlin, 1925, aus der *Biologischen Reichsanstalt für Land und Forstwirtschaft*, Berlin-Dahlem).
- MUTNOWSKI (R. A.) (Moscow-Idaho). — Etudes sur le sang des insectes (*Bull. de la Soc. Entomol.*, 1923-24, Brooklyn).
- NEDRIGAILOF (D.). — Immunité des chenilles *G. mellonella* contre différents microbes. Thèse en russe, 1910 (Kharkoff).
- PAILLOT (A.). — Cytologie du sang des chenilles de Macrolépidoptères (*C. R. Acad. Sci.*, 1919, t. 169, p. 202).
- La caryocinétose, nouvelle réaction d'immunité naturelle observée chez les chenilles de Macrolépidoptères (*C. R. Acad. Sci.*, 1919, t. 169, p. 396).
- La caryocinétose, (faits nouveaux et considérations générales (*C. R. Acad. Sci.*, 1919, t. 169, p. 740).
- L'immunité naturelle chez les Insectes. Etude d'un cas d'immunité humorale (*C. R. Acad. Sci.*, 1919, t. 169, p. 1122).

- Sur les œnocytoïdes et les tératocytes (*C. R. Acad. Sci.*, 1920, t. 171).
- L'immunité acquise chez les Insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 278).
- La phagocytose chez les Insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 425).
- Sur la caryocinétose et les réactions similaires chez les vertébrés (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 427).
- Sur une réaction des micronucléocytes de chenilles d'*Euproctis chalybeata* contaminées par *B. melolonthæ liquefaciens* (*C. R. Soc. Biol.*, 1920, t. 83, p. 615).
- Rôle des humeurs dans la destruction extracellulaire des microbes chez les Insectes (*C. R. Acad. Sci.*, 1921, t. 172).
- Mécanisme de l'immunité humorale chez les Insectes (*C. R. Acad. Sci.*, 1921, t. 172, p. 397).
- Contribution à l'étude de l'immunité humorale chez les Insectes (*C. R. Acad. Sci.*, 1921, t. 172, p. 546).
- Influence de la température sur le mécanisme de l'immunité humorale chez les Insectes (*C. R. Soc. Biol.*, 1921, t. 84, p. 737).
- Les maladies bactériennes des Insectes. Utilisation en Agriculture des Bactéries entomophytes (*Ann. des épiphyties*, 1922, t. 8, p. 95).
- Sur l'étiologie et l'épidémiologie de la grasserie du ver à soie (*C. R. Acad. Sci.*, 1924, t. 179, p. 229).
- PASTEUR (L.). — Etude sur la maladie des vers à soie (Paris, 1870).
- PERTZEFF (V.). — Sur la lipase des chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Acad. Sci.*, 1928, t. 187, p. 253-255).
- SAUNDERS (E. W.), WISDOM (W. E.) and WHITE (T. W.). — Epizootie transmitted through its toxi-virulent larva and its relation to Simian and human poliomyelitis (*Journ. Missouri State Med. Ass.*, 1921, t. 18, f. 4).
- SERGEANT (E.) et LHÉRIOTIER (A.). — Essai de destruction des sauterelles en Algérie par le *Coccobacillus acridiomini* d'Hérelle (*Ann. Inst. Pasteur*, 1914, t. 28, p. 408-419).
- Campagne d'expérimentation de la méthode biologique contre les *Schistocerca gregaria* dans la vallée de la Haute-Tafna, commune mixte de Sebden (département d'Oran). Existence d'une épidémie autochtone vaccinant (mai, juin, juillet 1915) (*Ann. Inst. Pasteur*, 1916, t. 30, p. 209-224).
- La lutte contre les sauterelles; résultats des expériences de 1913 (*Bull. bi-mensuel off. Gouvern. gen., Alg.*, 1914, t. XX, p. 26).
- TATEIWA (J.). — La formule leucocytaire du sang des chenilles normales et immunisées de *Galleria mellonella* (*Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1928, t. 42, p. 791).
- TOUMANOFF (K.). — La tuberculose expérimentale chez le Phasme *Dixipus morosus* (*C. R. Soc. Biol.*, 1925, t. 92, p. 14-16).
- Essais sur l'immunisation des abeilles (*C. R. Acad. Sci.*, 1927, t. 185, p. 1078).
- Au sujet de l'aspergillomycose des Abeilles (*C. R. Acad. Sci.*, 1929, t. 187, p. 1259-1261).
- L'immunisation et la phagocytose chez les larves d'Abeilles (*C. R. Soc. Biol.*, 1930, t. 103, p. 968-970).
- VICHER (M.). — Contribution à l'étude de l'immunité chez les Insectes. Recherche des anticorps filtrants et du principe bactériophage (Montpellier, Emmanuel Montane, édit. 1918, p. 1-105).

- WHITE (G. E.). — Cutworm septicemia (*Journ. of Agr. Researches*, 1923, t. 25, f. 10, p. 487-496).
- WILKINS (S.) and DUTCHER (R. A.). — Limberneck in poultry (*Journ. Amer. Vet. Med. Assoc.* 1920, t. 57, p. 653-685).
- ZERNOFF (V.). — L'immunité passive chez *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1927, t. 37, p. 1697).
- Sur la nature de l'immunité passive chez les chenilles de *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. 99, p. 315-316).
- De la spécificité de l'immunité passive chez *Galleria mellonella* (*C. R. Soc. Biol.*, 1928, t. 98, p. 1500).
- Essai de sérothérapie chez *Galleria mellonella* (*C. R. Acad. Sci.*, 1929, t. 188, p. 1321-1323).
- Immunité passive et sérothérapie chez les Insectes (chenilles de *Galleria mellonella*) (*Ann. Inst. Pasteur*, 1930, t. 44, p. 604-619).
-
-

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

- Symbiose des insectes avec les végétaux inférieurs.
- Les corpuscules métachromatiques, spécialement chez les Bactéries.

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 26 mars 1931.

Le Doyen de la Faculté des Sciences.

CH. MAURAIN.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris.

S. CHARLÉTY.

